

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO CARPES NUNES

A QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE LIGANTES LUMINESCENTES
DERIVADOS DA ACRIDINA. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÃO COMO SONDAS FLUORESCENTES PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS.

CIDADE

2019

MARCELO CARPES NUNES

A QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE LIGANTES LUMINESCENTES
DERIVADOS DA ACRIDINA. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÃO COMO SONDAS FLUORESCENTES PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS.

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Química ao curso de Pós-Graduação em
Química, Setor de Ciências Exatas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Souza Nunes

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

N972q	<p>Nunes, Marcelo Carpes</p> <p>A química de coordenação de ligantes luminescentes derivados da Acridina. Síntese, caracterização e aplicação como sondas fluorescentes para quantificação de íons metálicos [recurso eletrônico] / Marcelo Carpes Nunes. – Curitiba, 2019.</p> <p>Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.</p> <p>Orientador: Fábio Souza Nunes .</p> <p>1. Ligantes (Bioquímica). 2. Acridina. 3. Zinco. 4. Mercúrio. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nunes, Fábio Souza. III. Título.</p> <p>CDD: 543.56</p>
-------	---

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MARCELO CARPES NUNES** intitulada: **A química de coordenação de ligantes luminescentes derivados da Acridina. Síntese, Caracterização e Aplicação como sondas fluorescentes para a quantificação de íons metálicos**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2019.

FÁBIO SOUZA NUNES

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

KAREN WOHN RATH

Avaliador Externo (UEPG)

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho a meus pais
José Luiz e Jussara, meus irmãos
André e Eduardo e a minhas avós
Geni e Maria (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado durante este período. Talvez eu não consiga expressar toda a minha gratidão por meio de palavras.

Inicialmente agradeço muitos à minha família, por todo carinho, apoio, motivação e incentivo durante toda a minha vida. Aos meus pais Jussara e José Luiz, por estarem sempre presentes, todo esforço para que eu e meus irmãos tivéssemos as melhores condições que lhes eram possível, e por sempre colocarem como prioridade nossa educação. Obrigado por todo exemplo que vocês se tornaram na minha vida e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Aos meus irmãos André e Eduardo, por toda cumplicidade, pelas longas conversas, momentos de risadas e bobagens, por me ouvirem nos momentos de desânimo, vocês estão sempre a alegrar meus dias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Souza Nunes agradeço pela oportunidade de trabalhar no seu Grupo de pesquisa ao longo destes seis anos, todo aprendizado, confiança, dedicação, motivação, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcio P. de Araújo agradeço pelas valiosas contribuições nas correções do projeto de mestrado, relatório anual e exame de qualificação, principalmente nas discussões relativas a espectroscopia RMN.

A Prof^a. Dra. Tatiana R. Simões agradeço pelas relevantes contribuições dadas no exame de qualificação.

Aos Prof^a. Dra. Karen Wohnrath e Prof. Dr. Gilberto Abate pelo aceite em participar desta banca de defesa de dissertação.

A Prof^a Dr^a Leni Campos e aos seus alunos por disponibilizar espaço e o espectrofluorímetro do Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (LaPPS-UFPR) o qual foi fundamental para conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr Leonardo de Boni e sua aluna Danyellen pelas medidas fotofísicas de rendimento quântico e tempo de vida no estado excitado.

Aos Prof. Dr. Henrique E. Toma (USP-SP) e o Prof. Dr. Koiti Araki (USP-SP) pelas medidas de análise elementar e espectrometria de massas.

A Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Rodrigues da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) por ter disponibilizado o espectrofluorímetro do Laboratório de Multiusuários.

As Prof^a. Dra. Jaísa F. Soares e Prof^a Dra Shirley Nakagaki por todo ensinamento repassado em suas ótimas aulas e pela convivência no laboratório durante esses anos. Ao

Prof. Dr. Ronny Rocha Ribeiro pelo convívio e conversas, durante suas passagens no laboratório e nos encontros de nosso Grupo, onde estava sempre presente.

Aos meus grandes amigos Gabriel Kaetan, Mayara Inoue, Katiana Ztiez, Jeniffer Mendes, Beatriz Valenca, Jucie Parreira, Tainara Batista, Karen Mary e Leticia Franco por todo apoio pelas discussões e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos amigos e colegas que estão ou passaram pelo grupo André Ferrarini, Caroline Mariano, Gabriel Silverio, Fabiane S. Carlos, Lucas Galvan, Mayara Inoue, Tiago Gouveia, Raquel Fochesato e Rafael Soek. Obrigado pela amizade, convivência diária e pelos momentos de discussão e descontração. Aos novos alunos Leticia, Rafael e Tomás boa sorte no início desta caminhada desejo que vocês aproveitem e aprendam muito dentro do grupo. Também agradeço ao Julio C. da Rocha que guiou a mim e a Raquel nos primeiros meses de nossa iniciação científica.

Aos amigos e colegas estão ou passaram pelo Laboratório de Química Bioinorgânica e Catalise: Ana, Ângela, Arianne, Bianca, Camila, Carla, Carolina, Charles, Danilo, Everton, Gabriel, Guilherme, João, Karen, Kátia, Kelly, Lucas, Mateus e Renaldo. Obrigado por apoio, pelas vidrarias emprestadas, pelas discussões científicas ou não científicas e pelos momentos de descontração.

A Prof^a. Dra. Elisa Orth e seus alunos do Grupo de Cinética e Catálise em especial o doutorando Valmir Baptista, que me acolheram no período de estágio supervisionado. Agradeço muito por todo aprendizado, por me guiarem pela físico-química e me contagiarem com a paixão que vocês trabalham.

Aos meus amigos da equipe de atletismo da UFPR: Carlos, Fernando, Franciele, Henrique, Jaqueline, Joice, Jonatan, Juliane, Leticia, Luiz (Baby), Mariane e Matheus e principalmente ao Prof. Dr. Vidal Palácios Calderón. Obrigado por cada treino, ajuda, viagem, conversa, pelos gritos e principalmente por todo apoio dentro e fora da pista.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelas bolsas concedidas durante a iniciação científica e no mestrado e pelo financiamento dos projetos do nosso grupo de pesquisa.

A Universidade Federal do Paraná em especial o Departamento de Química, por toda infraestrutura e pessoal, que permitiram a minha formação de como bacharel, licenciado e mestre. E a todos os professores e instituições de ensino por onde passei, que me deram base para alcançar este sonho.

RESUMO

Metodologias analíticas modernas baseadas em fluorescência têm atraído interesse devido às características únicas na marcha analítica, como o uso de equipamentos de baixo custo e alta sensibilidade. Deste modo, observa-se um esforço visando o desenvolvimento de novos *Sensores Moleculares Fluorescentes* cada vez mais sensíveis e seletivos. Dentre os vários fluoróforos explorados, a acridina tem despertado interesse de alguns pesquisadores, contudo comparativamente a outras moléculas fluorescentes, ainda são poucos os relatos do seu de seus derivados para o desenvolvimento de sensores químicos na literatura. Dentro deste contexto, este trabalho reporta a síntese de novos sensores químicos baseados na acridina. Do ponto de vista da química de coordenação, estes sensores são ligantes polifuncionais com diferentes átomos doadores ($-NH_2$, $-OH$ e $-SH$) e exibem seletividade única para cátions de íons metálicos em solução aquosa. Sendo assim, foram sintetizados e caracterizados três sensores fluorescentes: a bis(hidroximetil)acridina (L_O), a bis(aminometil)acridina (L_N) e a bis(hidrogenotimetil)acridina (L_S). Para os três sensores foram observados um máximo de emissão próximas a 430 nm com rendimentos quânticos inferiores a 1%. O ligante L_N mostrou-se um sensor de alta sensibilidade para a determinação de Zn^{2+} , exibindo intensificação na emissão, explicado pelo mecanismo de Transferência de Energia de Dexter, também conhecido como mecanismo de Transferência de Carga Fotoinduzida. Os experimentos de Job e Benesi-Hildebrand indicaram a formação de um complexo de estequiometria 2:1(metal:ligante) ($[Zn_2(L_N)Cl_4]$) com constante de afinidade igual a $2,43 \times 10^{14} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$, indicando a formação de um complexo muito estável. O sensor L_N apresentou limite de detecção de $5,36 \mu\text{mol L}^{-1}$, uma faixa de resposta linear relativamente ampla, de $17,8$ a $600 \mu\text{mol L}^{-1}$. A o uso do sensor L na quantificação de Zn^{2+} foi aprovada em testes de repetitividade e precisão intermediária. Quando avaliado sua robustez, o método mostrou que variações no pH e na concentração do tampão devem ser evitadas para que haja repetitividade na metodologia. Em ensaios de competição, os ânions e os cátions testados não são interferentes importantes na detecção e quantificação do íon Zn^{2+} . Quando avaliados os efeitos de matriz foi possível observar que o sensor L_N se comporta bem em água destilada, mineral e potável, contudo em uma matriz mais complexa, como a do fertilizante, o método não se mostrou confiável. O sensor L_S se mostrou seletivo para íons de metais pesados como Hg^{2+} e Cd^{2+} , formando complexos na razão 1:1 sensor/analito ($[Hg(L_S)]$), havendo supressão parcial da fluorescência (com constante de supressão de $1,85 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$) segundo os formalismos de Job e Stern-Volmer. O complexo de mercúrio(II) apresentou constante de formação igual a $5,14 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ através da equação de Benesi-Hildebrand. O sensor L_O não apresentou seletividade a nenhum dos cátions testados

Palavras-chave: Sensor Molecular Fluorescente. Acridina. Ligante polidentado. Zinco. Mercúrio.

ABSTRACT

Modern analytics methods based in fluorescence have being of great interest due to their unique characteristics such as, low cost equipments and high sensitivity. Therefore, there is an immediate concern to the development of new *Molecular Fluorescent Sensors* with enhanced sensitive and selective properties. Among several fluorophore molecules, acridine is interesting because new reports are seen in the literature. Thus, herein we report the synthesis of new chemical sensors based in the acridine. Considering the coordination chemistry approach, the molecules are polyfunctional ligands that contain different donor atoms ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ and $-\text{SH}$), and exhibited unique selectivity for metal ion cations in water solution. The ligands referred to as bis(hydroxymethyl)acridine (L_O), bis(aminomethyl)adridine (L_N) and bis(thiolmethyl)adridine) emits around 430 nm, and shows quantum yields lower than 1%. Among them, L_N exhibited a high selectivity of Zn^{2+} cations, following by an increase in the fluorescence intensity, and explained by the Dexter's Energy Transfer Mechanism, also known as Photoinduced Charge Transfer Mechanism. Job's and Benesi-Hildebrand's methods allowed the determination of a 1:2 sensor-to-analyte stoichiometry ($[\text{Zn}_2(\text{L}_\text{N})\text{Cl}_4]$), and a high affinity constant of $2.43 \times 10^{14} \text{ mol}^2 \text{L}^{-2}$, which is in accordance with a very stable complex. Sensor L_N showed a limit of quantification for Zn^{2+} ions as low as $5.36 \mu\text{mol L}^{-1}$, and a large linear response in the range of $17.8\text{--}600 \mu\text{mol L}^{-1}$. The method passed the Repetitvity and the Intermediate Precision tests, as long the some variables, namely: pH and buffer are kept constant. The method also passed the Competition Tests, where no significant interference was found for all of the cations and anions tested. The matrix did not offered considerable effects on the results for analysis conducted from distilled, mineral and tap water sources, but the method failed for more a complex matrix such as a fertilizer. Sensor L_S showed selectivity for the metal ions, Hg^{2+} and Cd^{2+} , forming 1:1 sensor/analyte complexes ($[\text{Hg}(\text{L}_\text{S})]$) as expressed by partial quenching of the measured luminescence (with a calculated quenching constant of $1.85 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$) supported by Stern-Volmer's and Job's formalisms. The mercury(II)-complex exhibit a formation constant of $5.14 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ calculated by the Benesi-Hildebrand's equations. At last, ligand L_O did not show any selectivity for the cations tested.

Keywords: Molecular Fluorescent Sensors, Acridine, Polyfunctional ligands, Zinc, Mercury.

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** - Diagrama de Jablonski, mostrando os processos de decaimentos após uma molécula absorver radiação eletromagnética. S_0 é o estado fundamental, S_1 e T_1 são os estados singletos e tripletos de menor energia, respectivamente. S_2 é o segundo estado singlete. As setas continuas representam os processos envolvendo fótons, e as setas tracejadas são as transições não-radiativas..... 3
- Esquema 2** - Sensores derivados da acridina usados neste projeto.11
- Esquema 3** - Rota sintética dos sensores derivados da acridina.16
- Esquema 4** - Diagrama de Jablonski simplificado.53
- Esquema 5** - (À cima) Ilustração do diagrama de energia dos orbitais de fronteira associados a emissão fluorescente da molécula de acridina (Ao meio) Ilustração da transferência de carga fotoinduzida PICT ou de Dexter, diminuindo a intensidade da fluorescência. (Em baixo) A ligação do grupo $-NH_2$ a um cátion inibi a comunicação entre os estados eletrônicos do fluoróforo, impedindo a transferência de carga e causando o aumento da intensidade de emissão radiativa.....59
- Esquema 6** - (A) Estabilização de orbitais no estado excitado pelo processo de transferência de carga fotoinduzida. parte doadora de densidade eletrônica encontra-se em vermelho, a aceptora em azul e o cátion em cinza, adaptado de [43] (B) Associação das regiões doadoras e aceptoras de densidade eletrônica na molécula.60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos fluorescentes de ocorrência natural.	4
Figura 2 - Ilustração dos componentes de um sensor químico fluorescente. Onde o sensor é composto por uma região de sinalização representada pelo fluoróforo (em amarelo) e uma região de reconhecimento do analito representada pela porção do receptor(em verde).	5
Figura 3 - Estruturas presentes em diversos esqueletos de sensores fluorescentes disponíveis comercialmente e descritos na literatura.	6
Figura 4 - Estrutura do xanteno e seus derivados usados como sondas fluorescentes e esquema de formação da espirolactona.	7
Figura 5 - Ligantes derivados do fluoreno sintetizados para íons Cu^{2+} . ²⁵ Mostrando as regiões associadas ao fluoróforo (em laranja) e ao receptor (em azul) dos sensores moleculares.	8
Figura 6 - Estrutura da acridina e do antraceno.	8
Figura 7 - Estrutura de alguns ligantes derivados de acridina aplicados como sensores de íons na literatura ^{28,31}	9
Figura 8 - Espectro vibracional FTIR do ligante L_O em pastilha de KBr.	28
Figura 9 - Espectro vibracional FTIR do ligante L_N em pastilha de KBr.	28
Figura 10 - Espectro vibracional FTIR do ligante L_S em pastilha de KBr.	29
Figura 11 - Espectro de Massas ESI (+) do ligante L_N	30
Figura 12 - Representação das espécies atribuídas aos principais picos do espectro.	31
Figura 13 - Ampliação do conjunto de picos (preto) e simulação considerando-se as distribuições isotópicas (vermelho) dos principais picos para os fragmentos observados no espectro do ligante L_N	32
Figura 14 - Espectro de Massas ESI (+) do ligante L_O	32

Figura 15 - (A) Ampliação do conjunto de picos (preto) e simulação considerando-se as distribuições isotópicas (vermelho) dos principais picos para os fragmentos observados no espectro do ligante L _O . (B) representação do íon molecular. ...	33
Figura 16 - Espectro de Massas ESI (+) do ligante L _S	33
Figura 17 - Ampliação do conjunto de picos (preto) e simulação da distribuição isotópica (vermelho) dos principais picos para os fragmentos observados no espectro do ligante L _S	34
Figura 18 - Representação das espécies atribuídas aos principais picos do espectro.	34
Figura 19 - Espectro de ¹ H-RMN do ligante L _N em uma mistura D ₂ O- <i>DMSO-d</i> ₆ (1 -1) - 200 MHz.	36
Figura 20 - Ampliação da região de 7,60 a 7,80 ppm do espectro apresentado na Figura 19.	37
Figura 21 - Espectro de ¹ H-COSY do ligante L _N em uma mistura D ₂ O- <i>DMSO-d</i> ₆ (1 -1).- 400 MHz.	37
Figura 22 - Espectro de ¹³ C{ ¹ H}-RMN do ligante do ligante L _N em uma mistura D ₂ O- <i>DMSO-d</i> ₆ (1 -1) – 50 MHz.	38
Figura 23 - Espectro de DEPT-135 do ligante do ligante L _N em uma mistura D ₂ O- <i>DMSO-d</i> ₆ (1 -1) -50 MHz.	39
Figura 24 - Espectro de ¹ H-HSQC do ligante L _N em uma mistura D ₂ O- <i>DMSO-d</i> ₆ (1 -1)- 50 MHz.	40
Figura 25 - Espectro de ¹ H-RMN do ligante L _O em CDCl ₃	41
Figura 26 - Espectro de ¹³ C-RMN do ligante L _O em CDCl ₃	43
Figura 27 - Espectro de DEPT-135 do ligante L _O em CDCl ₃	43
Figura 28 - Fragmento do Espectro de ¹ H-HSQC do ligante L _O em CDCl ₃	44
Figura 29 - Espectro de ¹ H-RMN do ligante L _S em <i>DMSO-d</i> ₆	45
Figura 30 - Espectro de ¹³ C-RMN do ligante L _S em <i>DMSO-d</i> ₆	46

Figura 31 - Espectro de DEPT-135 do ligante L _S em DMSO- <i>d</i> ₆	47
Figura 32 - Espectro eletrônico do ligante L _O em metanol.	48
Figura 33 - Espectros de contorno da emissão do sensor L _O . Obtidos com <i>slit's</i> de excitação e emissão de 10 mm.	49
Figura 34 - Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{Ex}} = 360 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{Em}} = 439 \text{ nm}$) do sensor L _O . Obtido com <i>slit's</i> de excitação e emissão de 10 mm.	50
Figura 35 - Espectros de contorno da emissão do sensor L _N . Obtido com <i>slit's</i> de excitação de 5 mm e emissão de 10 mm.....	50
Figura 36 - Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{Em}} = 358 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{Em}} = 430 \text{ nm}$) do sensor L _N . Obtido com <i>slit's</i> de excitação de 5 mm e emissão de 10 mm.	51
Figura 37 - Espectros de contorno da emissão do sensor L _S . Obtidos com <i>slit's</i> de excitação de 5 mm e emissão de 20 mm.....	51
Figura 38 - Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{Em}} = 358 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{Em}} = 430 \text{ nm}$) do sensor L _S . Obtido com <i>slit's</i> de excitação de 5 mm e emissão de 20 mm.	52
Figura 39 - Espectros de emissão do ligante para o sensor L _O ($\lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm}$).	55
Figura 40 - Intensidade de emissão do ligante na presença de diversos cátions para o Ligante L _O ($\lambda_{\text{Ex}}= 355 \text{ nm}$; $c_{\text{Lo}}= 100 \text{ mmol L}^{-1}$ e $c_{\text{A}}= 100 \text{ mmol L}^{-1}$).	56
Figura 41 - Espectros de emissão do ligante na presença do cátion Zn ²⁺ para o ligante L _N ($\lambda_{\text{Ex}}= 355 \text{ nm}$).	56
Figura 42 - Intensidade de emissão dos ligantes e na presença de diversos cátions para o Ligante L _N ($\lambda_{\text{Ex}}= 355 \text{ nm}$; $c_{\text{LN}}= 100 \text{ mmol L}^{-1}$ e $c_{\text{A}}= 100 \text{ mmol L}^{-1}$).	57
Figura 43 - Imagem da Emissão do ligante na presença e na ausência do ion Zn ²⁺	57
Figura 44 - Espectros de emissão do ligante e na presença do cátion Hg ²⁺ para o ligante L _S ($\lambda_{\text{Ex}}=355 \text{ nm}$).	61
Figura 45 - Intensidade de emissão dos ligantes na presença de diversos cátions para o Ligante L _S ($\lambda_{\text{Ex}}=355 \text{ nm}$; $c_{\text{LS}}= 100 \text{ mmol L}^{-1}$ e $c_{\text{A}}= 100 \text{ mmol L}^{-1}$).	62

Figura 46 - Gráfico de Job para a formação do complexo $[Zn_2(L_N)]$, onde monitorou-se a variação de emissão em diferentes razões molares.....	63
Figura 47 - Proposta para o complexo neutro $[Zn_2(L_N) Cl_4]$ onde os átomos de as cores ciano, azul, branco e verde representam respectivamente os átomos de carbono, nitrogênio, Zinco e cloro respectivamente.....	64
Figura 48 - Gráfico de Job para a formação do complexo $[Hg(L_S)]$, onde monitorou-se a variação de emissão em diferentes razões molares.....	64
Figura 49 - Proposta para o complexo neutro $[Hg(L_S)]$	65
Figura 50 - Gráfico de linearização de Benesi-Hildebrand para formação do complexo $[Zn_2(L_N) Cl_4]$	66
Figura 51 - Gráfico de linearização de Benesi-Hildebrand para formação do complexo $[Hg(L_S)]$	66
Figura 52 - Gráfico de linearização de Stern-Volmer pra o sensor L_S na presença de Hg^{2+}	67
Figura 53 - Espectros de emissão em diferentes concentrações de Zn^{2+} , pH=8,20 (Tampão Tris-HCl-KOH).....	68
Figura 54 - Curva de correlação de emissão do sensor L_N em resposta ao aumento na concentração de Zn^{2+} (N=3; Tampão Tris-HCl-KOH).	68
Figura 55 - Curva analítica para quantificação de Zn^{2+} na presença do sensor L_N	72
Figura 56 - Resultados dos ensaios de repetitividade em três períodos de tempo e dois níveis de concentração (Nível 1 - $c_{Zn^{2+}} = 200 \mu mol L^{-1}$; Nível 2 - $c_{Zn^{2+}} = 400 \mu mol L^{-1}$).	79
Figura 57 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária entre dois analistas no nível de concentração 3 ($c_{Zn^{2+}} = 20 \mu mol L^{-1}$).	81
Figura 58 - Gráfico de Pareto para os efeitos avaliados pelo planejamento fatorial fracionário.....	83
Figura 59 - Avaliação de possíveis cátions interferentes.	84

Figura 60 - Avaliação de possíveis ânions interferentes.	84
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parametros nominais da metodologia analítica proposta.	23
Tabela 2 - Condições nominais e variadas no teste de Youden.....	24
Tabela 3 - Combinações fatoriais usadas no teste de Youden.....	25
Tabela 4 - Valores experimentais e calculados para os ligantes L _N , L _O e L _S	27
Tabela 5 - Atribuição tentativa das principais bandas dos espectros FTIR dos ligantes L _N , L _O e L _S	29
Tabela 6 - Deslocamentos químicos e valores de integração referentes ao espectro de ¹ H-RMN de L _N	36
Tabela 7 - Deslocamentos químicos referentes aos espectros de ¹³ C-RMN e DEPT-135 de L _N	39
Tabela 8 - Deslocamentos químicos e valores de integração referentes ao espectro de ¹ H-RMN de L _O	42
Tabela 9 - Deslocamentos químicos referentes aos espectros de ¹³ C-RMN e DEPT-135 de L _O	44
Tabela 10 - Deslocamentos químicos e valores de integração referentes ao espectro de ¹ H-RMN de L _S	45
Tabela 11 - Deslocamentos químicos referente aos espectros de ¹³ C-RMN e DEPT-135 de L _S	47
Tabela 12 - Atribuição tentativa e valores de absorvidade molar das bandas do espectro UV-Vis dos ligantes L _O , L _N e L _S	49
Tabela 13 - Valores dos máximos de excitação e emissão para os sensores L _O , L _N e L _S . .	54
Tabela 14 - Dados do teste de Grubbs para os valores de intensidade de emissão da Figura 56.	70
Tabela 15 - Dados, agrupamentos e resultados dos Testes F.	73

Tabela 16 - Variância dos resíduos e dados do Teste C de Cochram.....	75
Tabela 17 - Dados e resultados do teste de Durbin-Watson.....	77
Tabela 18 - Figuras de mérito obtidas pela curva analítica para quantificação de Zn^{2+} na presença do sensor L_N	78
Tabela 19 - Resultados dos ensaios de repetitividade avaliados pela razão HorRat.	79
Tabela 20 - Teste de Dixon para o ensaio de repetibilidade.....	80
Tabela 21 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária avaliados pela razão HorRat.	81
Tabela 22 - Parâmetros avaliados no teste de robustez.	82
Tabela 23 - Resultado dos testes de recuperação para determinação de Zn^{2+} com o sensor L_N em diferentes tipos de amostra(N=3, e recuperação de $100 \mu mol L^{-1}$).	85
Tabela 24 - Comparação entre as figuras de mérito analíticas e as constantes de afinidade obtidas para o sensor L_N com outros sensores para Zn^{2+} descritos na literatura.	86

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Fluorescência.....	1
1.2.	Sensores Moleculares Fluorescentes	4
1.3.	Acridina	7
2.	OBJETIVOS	10
2.1.	Objetivos Gerais	10
2.2.	Objetivos Específicos	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1.	Reagentes e Solventes	11
3.2.	Condições de Atmosfera Inerte	11
3.3.	Análise Instrumental.....	11
3.3.1.	Análise Elementar	11
3.3.2.	Espectroscopia de emissão fluorescente.....	12
3.3.3.	Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	12
3.3.4.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN) e Carbono (^{13}C -RMN e DEPT-135).....	13
3.3.5.	Espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS)	13
3.4.	Metodologia.....	14
3.4.1.	Síntese dos ligantes	14
3.4.2.	Determinação do pKa do Ligante L_N	18
3.4.3.	Preparo de Solução Tampão Tris-HCl-KOH	18
3.4.4.	Ensaio de sensibilidade dos sensores frente a presença de diferentes cátions em solução.....	18
3.4.5.	Determinação de estequiometria dos complexos formados em solução	19
3.4.6.	Determinação das constantes de estabilidade e de supressão dos complexos formados em solução.....	19
3.4.7.	Estimativa das figuras de mérito e validação do uso dos ligantes como metodologia analítica na determinação dos cátions de interesse	20

3.4.8.	Análise de possíveis interferentes	23
3.4.9.	Aplicação do método em amostras reais	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1.	Caracterização do ligantes	25
4.1.1.	Análise Elementar	25
4.1.2.	Espectroscopia vibracional (FTIR)	26
4.1.3.	Espectrometria de Massas	28
4.1.4.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	32
4.1.5.	Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis	45
4.1.6.	Espectroscopia de emissão fluorescente.....	46
4.2.	Investigação de seletividade dos ligantes frente a cátions inorgânicos.....	52
4.2.1.	Ensaio de sensibilidade dos ligantes frente a presença de diferentes cátions em solução.....	53
4.2.2.	Determinação de estequiometria e da constante de estabilidade do complexo formado em solução	59
4.2.3.	Aplicação do ligante L_N na quantificação dos cátions Zn^{2+}	63
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	81
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO

Um sensor químico pode ser definido como um dispositivo capaz de detectar variações físicas e/ou químicas, como uma espécie química que reconhece a presença de um analito com uma mudança mensurável¹. Idealmente, um sensor químico deve ser seletivo para uma molécula de analito frente às moléculas de outra natureza e também deve permitir que a concentração do analito seja monitorada¹.

O reconhecimento molecular ocorre na parte denominada como receptor destes sensores.¹ Para que este reconhecimento ocorra características como a geometria, tamanho, o número a natureza e a posição de átomos ou grupos doadores de densidade eletrônica presentes no ligante devem ser consideradas em função da natureza da espécie de interesse². Desta forma pode-se planejar sensores com maior afinidade para analitos com determinadas particularidades. Permitindo a síntese de sensores com alta especificidade e seletividade baseada na interação/ligação receptor-analito³. A ligação do analito nesta parte da molécula é expressa na forma de mudança de propriedades físico-químicas do sensor.

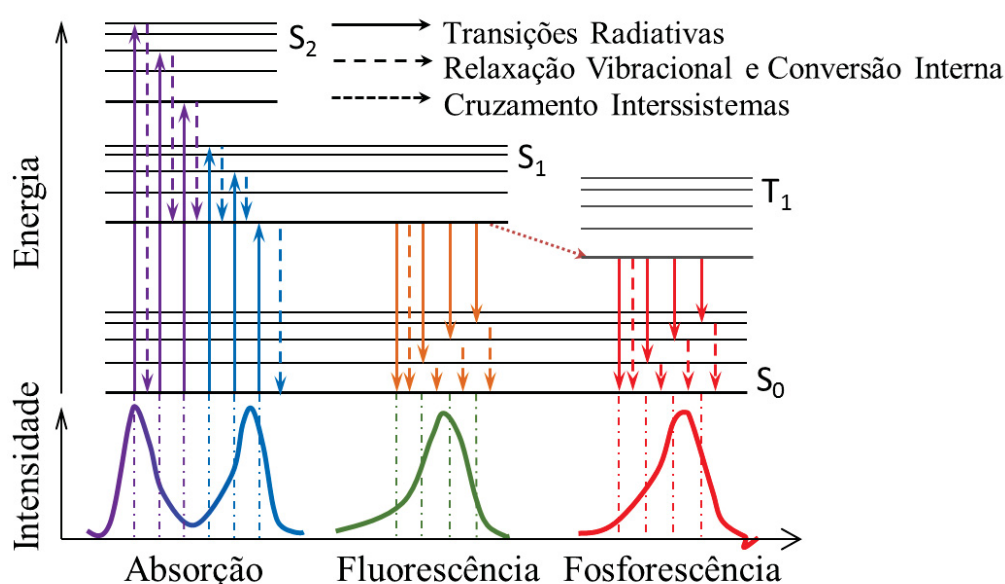
Estes sensores podem ser classificados conforme o tipo de propriedade que é alterada na presença do analito podendo ser óptico, eletroquímico, magnéticos ou térmicos, sendo os dois primeiros tipos citados os mais comuns⁴⁻⁶. Em sensores eletroquímicos, uma unidade ativa redox é associada a um receptor. A ligação da analito causa uma alteração nas propriedades redox do receptor e esta mudança é medida, por exemplo, por técnicas eletroquímicas. Em sensores ópticos, as propriedades fotofísicas como absorbância, refletância, fluorescência, índice de refração e espalhamento de luz, são alteradas com a ligação da molécula de interesse ao receptor⁷⁻¹⁰. Este tipo de sensor tem ganhado destaque na literatura, devido à sua simplicidade operacional, onde a detecção pode ser feita a olho nu, por espectrofotometria ou fluorimetria, enquanto outros métodos requerem instrumentação de alto custo^{6,9}. Outro fator que tem atraído o interesse, é que quando aplicadas em amostras biológicas, estes sensores ópticos não resultam na destruição de células e tecidos. Como alternativa a esses métodos, os sensores fluorescentes têm demonstrado serem ferramentas poderosas para a geração de imagens não destrutivas da distribuição intracelular de analitos em células isoladas⁷. Por isso, os métodos ópticos, como a espectrofotometria UV e a detecção baseada na fluorimetria, têm recebido bastante destaque na literatura¹¹. Além de ser uma metodologia simples, barata, altamente sensível e de fácil aplicação¹².

1.1. Fluorescência

A luminescência é o fenômeno que descreve a emissão de fótons por corpos frios, após excitação por absorção de fótons pelo material^{8,13}. Onde as moléculas absorvem a radiação, indo para estados excitados e estes estados de maior energia decaem radiativamente.

Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria ela pode ser absorvida ou espalhada. A absorção de radiação eletromagnética por átomos e moléculas gera espécies excitadas (como mostrado no Esquema 1 pelas transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$), que para retornar ao seu estado fundamental liberam energia por diversos mecanismos, como mostrado no Esquema 1, sendo os processos de relaxação não-radiativos (transições $S_1 \rightarrow S_0$, $S_2 \rightarrow S_0$, $S_2 \rightarrow S_1$ e $T_1 \rightarrow S_0$ do Esquema 1, representado pelas linhas tracejadas no Esquema 1), como o vibracional, o mais comum. Embora todas as moléculas apresentem a capacidade de absorver radiação, apenas algumas apresentam a propriedade de decair radiativamente e emitindo seu excesso de energia como fótons e esta propriedade é conhecida como fotoluminescência. A liberação deste fóton pode ocorrer por processos distintos: fluorescência e a fosforescência.^{8,14}

Estes dois processos diferem quanto à multiplicidade de spin eletrônico da molécula nos estados excitado e fundamental envolvidos na emissão. Na fluorescência observa-se que a multiplicidade de spin dos estados envolvidos é retida, como visto na transição $S_1 \rightarrow S_0$ do Esquema 1, enquanto que na fosforescência existem mudanças na multiplicidade de spin dos estados, como transição $T_1 \rightarrow S_0$ presente no Esquema 1, onde a transição envolver um estado tripleto e outro singleto da molécula, o estado de tripleto é gerado pelo cruzamento intersistemas durante o decaimento vibracional da molécula. E como reflexo, a emissão por fosforescência ocorre de forma muito mais lenta, devido à transição eletrônica entre os estados envolvidos ser proibida^{14, 17}.



Esquema 1: Diagrama de Jablonski, mostrando os processos de decaimentos após uma molécula absorver radiação eletromagnética. S₀ é o estado fundamental, S₁ e T₁ são os estados singletos e tripletos de menor energia, respectivamente. S₂ é o segundo estado singlete. As setas contínuas representam os processos envolvendo fótons, e as setas tracejadas são as transições não-radiativas.

Devido à perda de energia por processos não radiativos, a emissão sempre ocorre em comprimentos de onda maiores que a excitação. A diferença entre os máximos de absorção(λ_{ex}) e emissão(λ_{em}) é conhecida como deslocamento Stokes¹⁸.

Nem todos os fótons absorvidos resultam em emissão de luz devido aos relaxamentos não radiativos. A razão entre a quantidade de fótons emitidos e absorvidos é denominado rendimento quântico (Φ), que descreve a eficiência de emissão do fluoróforo. Outro parâmetro importante é o tempo de vida da fluorescência (τ), um valor diretamente proporcional ao tempo que a espécie permanece em seu estado excitado e à sua estabilidade. Essas propriedades do estado excitado formado são determinadas pela natureza da espécie fluorescente e do meio em que está dissolvida.

O uso de propriedades de emissão com fim analítico em análises de detecção e quantificação de substâncias é conhecido como fluorimetria. A intensidade de emissão é o parâmetro mais usado. A fluorescência para fins analíticos é multidimensional, e considera vários parâmetros como alterações no espectro de emissão e a variação no tempo de vida do fluoróforo excitado na presença do analito. Em razão da alta sensibilidade das medidas de fluorescência, elas estão também sujeitas a vários efeitos de interferência, o que requer um alto rigor e controle de parâmetros como a temperatura, comprimento de onda de

excitação e emissão da amostra, efeitos de reabsorção da amostra, efeitos de solvente na intensidade de emissão da amostra, emissão do solvente, largura de fenda de excitação e detecção, e interferência de outros analitos presentes em solução^{17,19,20}. Por outro lado, esta grande sensibilidade pode ser usada no desenvolvimento de sensores de diversos tipos¹⁵.

Quando um analito é fluorescente, a detecção direta é possível por meio do espectro de emissão característico desta espécie. Esta abordagem têm sido aplicada em análises diversas em processos industriais e monitoramento de espécies de relevância ambiental como de poluentes de ar e água, óleos, alimentos, drogas, na determinação de hidrocarbonetos aromáticos em diversas matrizes como óleos brutos e solos contaminados e de alguns compostos naturais como aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano; vitaminas como retinol e o ácido fólico; coenzimas como o FAD e NADH em análises clínica e Forense^{14,15} (Figura 1).

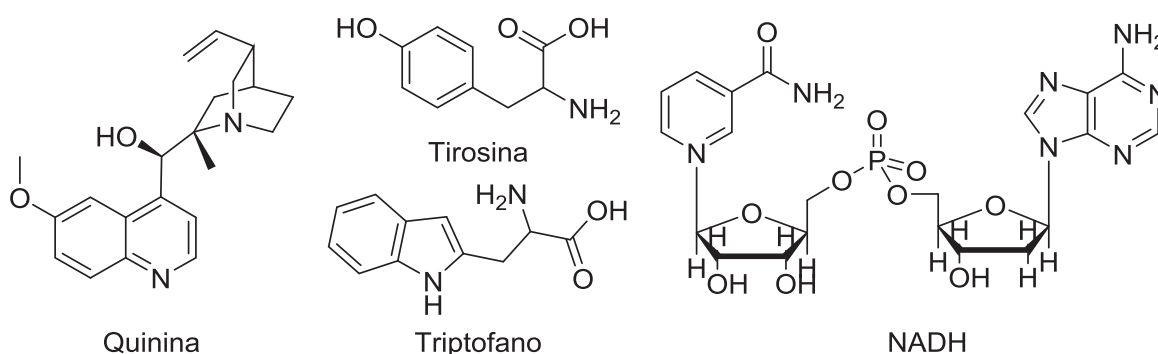


Figura 1: Compostos fluorescentes de ocorrência natural.

Contudo a fluorescência não é um fenômeno corriqueiro e a maioria das espécies de interesse não apresenta esta propriedade, fazendo-se necessário o uso de métodos de detecção indiretos para determinação de uma vasta classe de substâncias como cátions (H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , etc.), ânions (halogenetos, citratos, carboxílatos, fosfatos, ATP, etc.), gases (O_2 , CO_2 , NO , etc.), analitos bioquímicos (aminoácidos, coenzimas, carboidratos, nucleotídeos, etc.) e macromoléculas biológicas (proteínas, DNA, etc.) em vários tipos de matrizes. Este tipo de metodologia faz o uso de moléculas responsivas e seletivas à presença de analitos específicos, denominadas sensores moleculares fluorescentes⁸.

1.2. Sensores Moleculares Fluorescentes

Os primeiros sensores fluorescentes foram introduzidos na década de 1970, ganhando destaque na década seguinte, quando o primeiro sensor fluorescente de cálcio foi combinado com um método para entregar tal molécula de forma não invasiva e irreversível através das membranas plasmáticas de células. Isso forneceu a primeira tecnologia usada rotineiramente para estudar homeostase dos íons em sistemas celulares *in vivo*⁹. Nos últimos 25 anos, este tipo de sensor tem atraído um interesse significativo devido a sua potencial aplicação em pesquisas biológicas e ambientais, com destaque para a determinação de íons metálicos^{7,9}. Além disso, a grande melhora na resolução dos instrumentos também deu impulso para o desenvolvimento de novos sensores em especial para íons metálicos em solução, em sistemas *in vitro* e *in vivo*⁹.

Um sensor molecular fluorescente pode ser descrito como uma molécula que responde a estímulos externos através de alterações em suas propriedades de emissão radiativa¹⁵. Segundo Fabbrizzi e colaboradores^{1,4,12,20,21}, estes sensores são constituídos por dois componentes fundamentais: uma unidade fluorescente ativa e uma unidade de controle, como mostrado na Figura 2. A unidade ativa do sensor consiste em grupo fluoróforo e a unidade de controle ou receptor, que é a parte que interage com o analito, ou seja, esta parte é a responsável pelo reconhecimento. A ligação do analito ao receptor pode mudar as propriedades de emissão, como o aumento ou supressão da intensidade fluorescente e desta forma, pode ser usado como sonda para a detecção seletiva de algumas espécies químicas^{8,22}



Figura 2: Ilustração dos componentes de um sensor químico fluorescente. Onde o sensor é composto por uma região de sinalização representada pelo **fluoróforo** (em amarelo) e uma região de reconhecimento do analito representada pela porção do **receptor**(em verde).

Introduzidos pelos trabalhos de Lehn, Pedersen e Cram² os conceitos de supramolecularidade, levaram à criação de moléculas capazes de reconhecimento molecular e seletivas para vários analitos. Assim o desenvolvimento de novos sensores baseados na interação intermolecular sensor-analito ganhou um grande impulso. Sob o ponto de vista da química de coordenação existe um maior interesse no desenvolvimento de moléculas que atuem no reconhecimento de íons metálicos, e vários trabalhos foram descritos explorando ligantes multidentados, lineares, tripodais e macrocíclicos. O “*design*” de tais sensores envolve muitos aspectos a serem considerados, como a sensibilidade e a seletividade da interação metal-ligante, natureza do solvente, temperatura, força-iônica e pH. A afinidade depende também das características do ligante, como o número e da natureza dos átomos ou grupos doadores de pares de elétrons para atender às características do analito (relação carga/raio e natureza química)^{1,23,24}.

Os principais sensores são baseados em pequenas moléculas orgânicas que estruturalmente apresentam insaturações que formam longos sistemas π conjugados em um sistema planar¹⁴, como as estruturas mostradas na Figura 3. É conhecida uma grande diversidade estrutural de que vem sendo aplicada como fluoróforos no desenvolvimento de novos sensores.

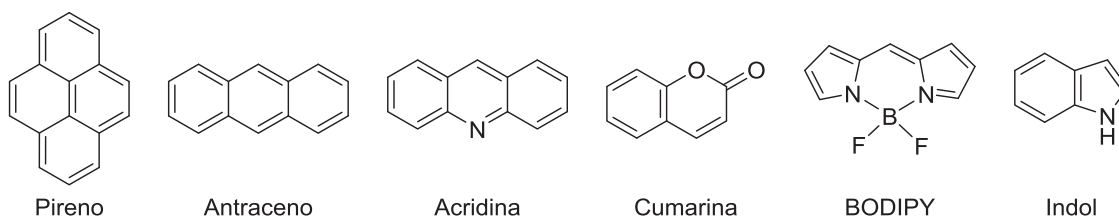


Figura 3: Estruturas presentes em diversos esqueletos de sensores fluorescentes disponíveis comercialmente e descritos na literatura.

Entre as moléculas sintéticas mais usadas sem dúvida os derivados sintéticos do xanteno, como a fluoresceína e rodamina, são as mais populares (Figura 4). Uma peculiaridade destes compostos é a formação da espirolactona, que não é fluorescente e cuja reação de abertura foi amplamente estudada na literatura em ensaios analíticos do tipo “*Turn on*”. A importância analítica desta classe reflete-se na grande quantidade e diversidade de produtos comerciais derivados xantêmicos como o DAF-2 e AlexaFluor 488[®].

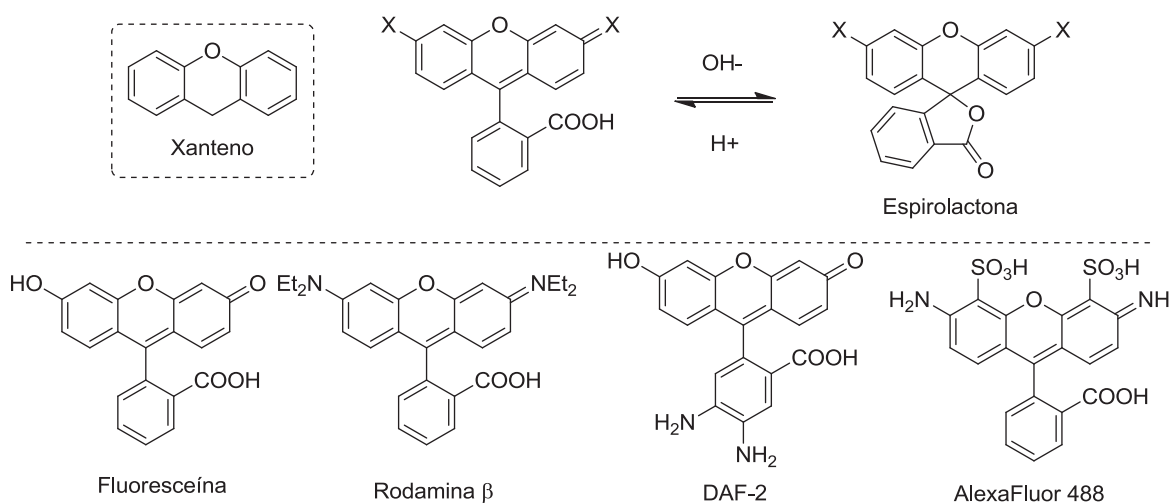


Figura 4: Estrutura do xanteno e seus derivados usados como sondas fluorescentes e esquema de formação da espirolactona.

A coordenação de um íon metálico pode causar uma intensificação da emissão de fluorescência, chamado efeito CHEF (do inglês *Chelation Enhanced Fluorescence Effect*); ou uma supressão da fluorescência, chamado CHEQ (do inglês *Chelation Enhancement Quenching Effect*).

Recentemente foi descrito por nosso grupo de pesquisa a síntese de quatro ligantes polidentados contendo fluoreno como grupamento fluoróforo^{25,26}, obtidos através da condensação de Schiff usando diferentes aldeídos com a diamidoamina substituída, como os descrito na Figura 5. Os resultados mais promissores foram com os dois ligantes acíclicos derivados da 2-formilpiridina e do salicilaldeído, e ambos os sistemas foram testados para a identificação e quantificação de íons metálicos, com destaque para íons de Cu²⁺. A quantificação foi sinalizada pela supressão da intensidade fluorescente do sistema. Para um dos ligantes, o estudo mostrou um limite de detecção (LOD) de aproximadamente 0,038 μmolL⁻¹ para o íon de Cu²⁺, considerado baixo quando comparado a sistemas análogos, com a formação de um complexo com estequiometria 1:2 (Ligante:Metal) e alta constante de estabilidade (2,07x10¹² L² mol⁻²) em solução de DMSO^{25,26}.

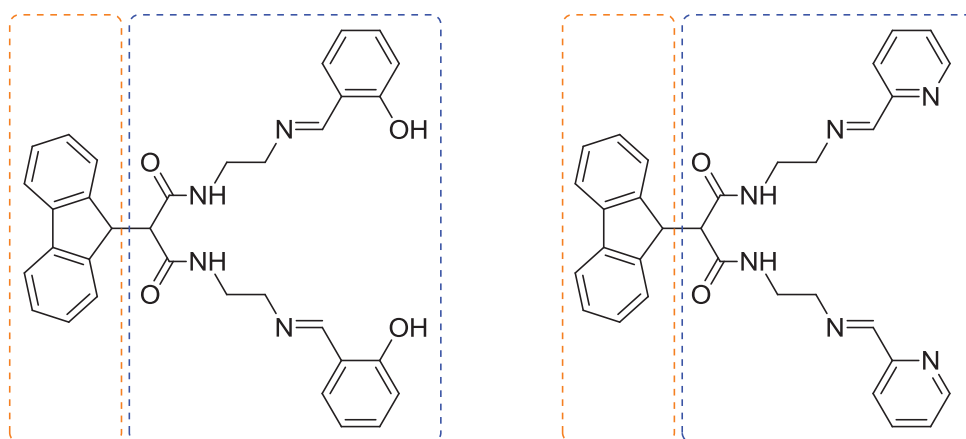


Figura 5: Ligantes derivados do fluoreno sintetizados para íons Cu^{2+} .²⁵Mostrando as regiões associadas ao **fluoróforo** (em laranja) e ao **receptor** (em azul) dos sensores moleculares.

1.3. Acridina

A acridina é um composto azo-heterocíclico análogo ao antraceno onde um grupo CH é substituído por um nitrogênio como heteroátomo, como mostrado na Figura 6. Compostos derivados de acridina vêm sendo bastante explorados e sintetizados na literatura em função de suas propriedades como corantes para a síntese de sondas fluorescentes em meio biológico, na preparação de compostos fotossensibilizadores para células solares e em terapia fotodinâmica; e por sua atividade biológica como agente antimicrobiano, antibacteriano, antitumoral, antiHIV, antimalárica e intercalante de DNA²⁷. Recentemente, algumas bis- e tetra-acridinas também mostraram atividade antiparasitária *in vitro* contra *Leishmania infantum*.²⁷

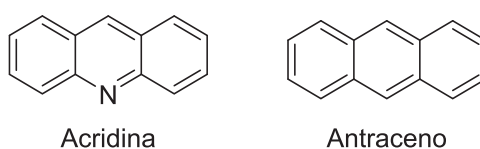


Figura 6: Estrutura da acridina e do antraceno.

A acridina e seus derivados têm despertado a atenção de pesquisadores devido a sua propriedade de fluorescência²⁸⁻³⁰. Contudo, ainda são poucos os relatos do seu uso para o desenvolvimento de sensores químicos quando comparado a outros fluoróforos, como a

cumarina. Na Figura 7 são apresentados alguns derivados presentes na literatura aplicados como sensores.

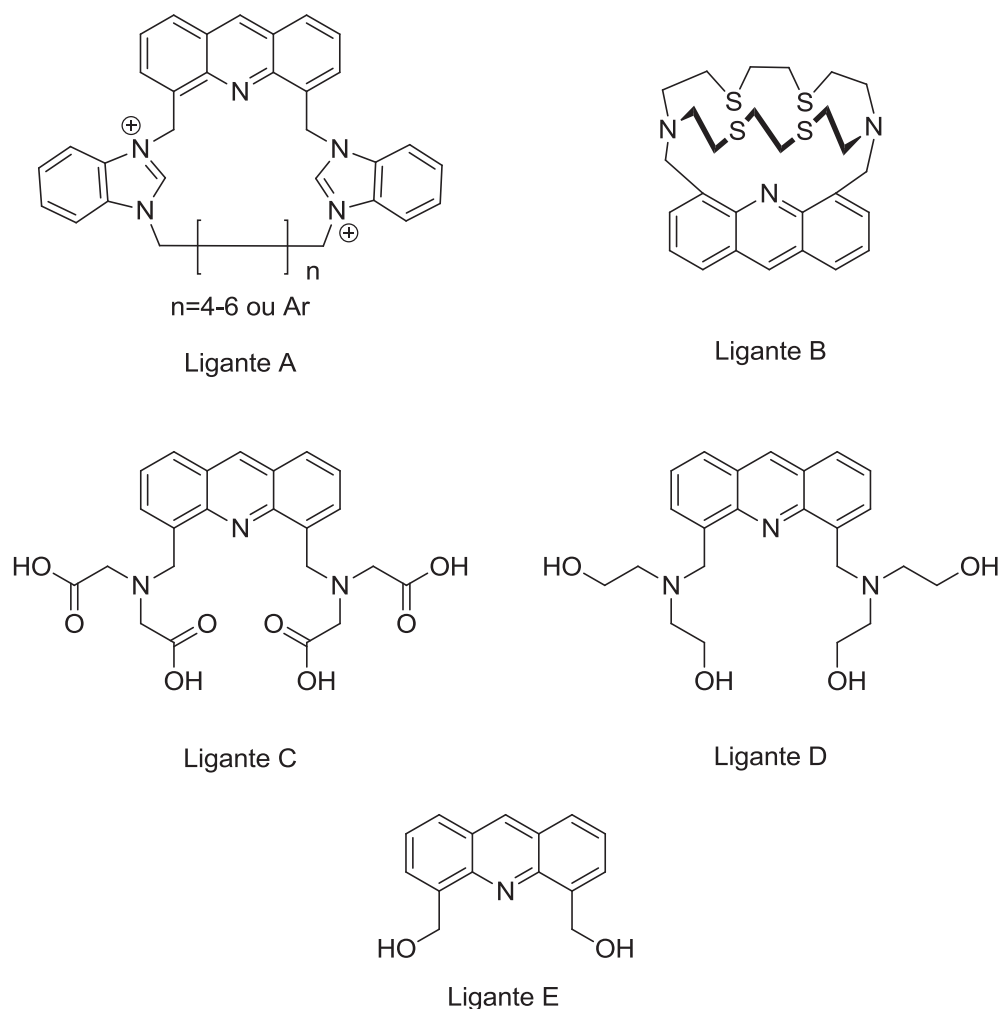


Figura 7: Estrutura de alguns ligantes derivados de acridina aplicados como sensores de íons na literatura^{28,31}.

Ligantes macrocíclicos contendo o grupo acridina, como o ligante **A** ilustrado na Figura 7, foram preparados e caracterizados estruturalmente por Zhang e colaboradores³². Estes foram aplicados como sensores para a detecção de íons dihidrogenofosfatos e a seletividade mostrou-se dependente do tamanho da cavidade macrocíclica e da sua rigidez. Foram observados eventos de fluorescência induzidos pela interação com o íon H_2PO_4^- através de ligações de hidrogênio com o ligante, levando a deslocamentos batocrômicos de 36 a 126 nm, resultando em mudanças significativas de cores da luminescência, do azul ao laranja-avermelhado, ocasionadas pela formação de excímeros (dímero de vida curta, que é

formado por duas moléculas, onde uma das moléculas encontra-se no estado excitado e a outra em seu estado fundamental⁸) através de interações π - π *stacking*³².

Ligantes do tipo tioéter-azacoroa (Ligante **B** da Figura 7) foram preparados por Lee e colaboradores³³ para a detecção de íons mercúrio e cádmio em células mamárias através da intensificação seletiva da fluorescência. A seletividade por estes metais é atribuída à natureza macia dos átomos doadores (base de Lewis) presentes na coroa.

O ligante ácido Acridinil-tetraacético (Ligante **C** da Figura 7) descrito por Wang e colaboradores³⁴ mostrou-se seletivo para íons Cu^{2+} , formando um complexo de estequiometria 1:1 e limite de detecção de $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções aquosas tamponadas em $\text{pH} = 7,4$. Outro novo sensor altamente seletivo para íons de Cd^{2+} foi relatado por Wang e colaboradores²⁸. Trata-se do 4,5-Bis(*N,N*-di(2-hidroxietil)aminometil)acridina (Ligante **D** da Figura 7), que forma um complexo 1:1 com íons de Cd^{2+} e um limite de detecção em meio aquoso de $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Recentemente, Zhou e colaboradores³¹ descreveram o uso da 4,5-Bis(hidroximetil)acridina (Ligante **E** da Figura 7) como quimiossensor seletivo para íons de paládio(II) em solução aquosa.

Neste sentido, este projeto tem como objetivo ampliar o conhecimento químico, em especial, a química de coordenação, de ligantes luminescentes derivados de acridina, funcionalizados com diferentes grupos que atuam como bases de Lewis, permitindo investigar e averiguar a possível aplicação destes ligantes como quimiossensores para íons metálicos e validar o uso dos resultados mais promissores como uma metodologia analítica.

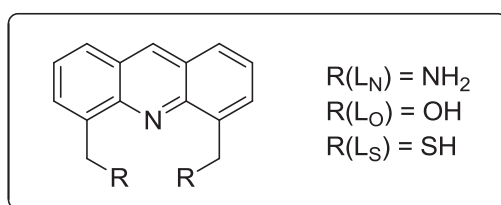
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Sintetizar e caracterizar sensores moleculares luminescentes derivados de acridina com átomos doadores de diferente natureza, estudar suas propriedades fotofísicas e sua potencial aplicação na detecção de íons metálicos.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Preparar e caracterizar os ligantes/sensores quelatos 4,5-Bis(aminometil)acridina (L_N), 4,5-Bis(hidroximetil)acridina (L_O) e 4,5-Bis(hidrogenosulfometil)acridina (L_S) (Esquema 2).
- ✓ Caracterizar os produtos por análise elementar, espectrometria de massas, técnicas espectroscópicas como: emissão fluorescente, absorção nas regiões do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e do Infravermelho (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
- ✓ Estudar as propriedades fotofísicas dos ligantes (rendimento quântico dos processos de emissão radiativa e tempos de vida de estados excitados).
- ✓ Investigar a potencialidade destes ligantes para o reconhecimento e a seletividade de cátions metálicos, e determinar as melhores condições para detecção de íons (sistemas de solventes, pH, limites de detecção e competição com outros íons).
- ✓ Investigar a estequiometria dos complexos formados em solução pelo método de Job e as afinidade relativas dos ligantes pelos íons metálicos através dos formalismos de Stern-Volmer e Benesi-Hildebrand.
- ✓ Estabelecer as principais figuras de mérito e validar o método analítico.
- ✓ Aplicar o método otimizado em amostras de água de diferentes origens.



Esquema 2: Sensores derivados da acridina usados neste projeto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Solventes

Acetato de Etila (Merck); Ácido Clorídrico (Alphatec); Ácido Sulfúrico (Biotec); Acridina (Aldrich); Antraceno (Aldrich); Brometo de Potássio (Aldrich); Bromometil-metil-éter (Aldrich); Carbonato de Cálcio (Ecibra); Cloreto de Sódio (Dinâmica); Cloreto de Lítio hidratado (Aldrich); Cloreto de Amônio (Dinâmica); Cloreto de tetrametilamônio (Aldrich); Cloreto de Magnésio (Vetec); Cloreto de Alumínio (Vetec); Cloreto de Potássio (Merck); Cloreto de Cálcio (Vetec); Sulfato de Vanadila (Aldrich); Cloreto de Cromo (Aldrich); Dicromato de Potássio (Alphatec); Cloreto de Manganês (Vetec); Permanganato de Potássio (Merck); Cloreto Ferro (III) Hexahidratado (Aldrich); Cloreto de cobalto (II) Hexahidratado (Dinâmica); Cloreto de Níquel Hexahidratado (Aldrich); Cloreto de Zinco (Aldrich); Cloreto de Zirconila octahidratado (Riedel-de Haën laboratory chemicals); Cloreto de Rutênio(III) (Aldrich); Cloreto de Paládio (Aldrich); Nitrato de Prata (Biotec); Cloreto de Cádmio (Fischer); Cloreto de Estanho (Ecibra); Cloreto de Mercúrio (Reagen); Cloreto de chumbo (Biotec); Clorofórmio (Alphatec); Diclorometano (Synth); Dimetilsulfóxido (Synth); Dioxano (Aldrich); Etanol (Dinâmica); Éter Etílico (Alphatec); Hidrazina hidratada - Solução aquosa 64% (Across); Hidróxido de Sódio (Synth); N-Hidroxiftalimida (Aldrich); Metanol (Dinâmica); Sílica gel, para cromatografia, 0,030-200 mm 60A (Across); Sulfato de Magnésio Anidro (Merck); Tiouréia (Carlo Erba).

Água Ultrapura foi obtida em sistema Millipore[®] Milli-Q system ($R = 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). Todos os reagentes e solventes foram utilizados sem tratamento prévio.

3.2. Condições de Atmosfera Inerte

A síntese da Bis(bromometil)acridina (precursor 1) foram conduzidas utilizando técnicas de Schlenk, em atmosfera de argônio (grau industrial, White Martins[®]) e vácuo de 10^{-4} Torr.

3.3. Análise Instrumental

3.3.1. Análise Elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), em um equipamento Perkin-Elmer, modelo CHN 2400.

3.3.2. Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR foram registrados no espectrômetro Bio-Rad Excalibur Series, modelo FTS3500GX, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , utilizando brometo de potássio (KBr) como meio dispersante.

3.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H -RMN) e Carbono (^{13}C -RMN e DEPT-135)

Os espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e DEPT-135 foram coletados em um espectrômetro BRUKER Model DRX de 200 MHz e campo de 4,7 Tesla do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Os espectros bidimensionais foram adquiridos em espectrômetro Bruker 400 MHz Advance HD no Laboratório de RMN do Departamento de Bioquímica no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os deslocamentos químicos foram determinados em relação ao tetrametilsilano (TMS) ou 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfonato de sódio (DSS).

3.3.4. Espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS)

Os espectros de massa foram registrados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), em um equipamento MicroTof Bruker Daltonics de fonte ESI (Ionização por Eletrospray) com analisador TOF (Tempo de voo)

de alta resolução (10000 FWHM), com injeção de amostra por infusão direta no Equipamento.

3.3.5. Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região do UV-vis

Os espectros eletrônicos foram obtidos utilizando o Hewlett Packard modelo 8452A de varredura rápida, com cela de quartzo com 1 cm de caminho óptico na região de 190 nm a 820 nm.

3.3.6. Espectroscopia de emissão fluorescente

As análises de excitação/emissão fluorescente e determinação de rendimento quântico foram realizadas no Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa – UFPR em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF5301-PC, com detector de potência igual a 800 volts, e com velocidade de varredura igual a 600 nm min.⁻¹. O comprimento de onda para excitação da amostra foi fixado em 355 nm. Os espectros de varredura de emissão e excitação dos ligantes foram realizados em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse na UTFPR-sede Ecoville. Antes das medidas, as soluções foram desoxigenadas com argônio, visto que o O₂ é altamente solúvel e um supressor colisional eficiente. As aberturas de fenda (“slit”) de excitação e detecção de emissão usadas nas análises encontram-se nas legendas das respectivas figuras.

As medidas de rendimento quântico foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, no IFSC da USP-São Carlos, em colaboração com o Prof. Dr. Leonardo de Boni. Foi usado acridina ($\phi_f^{ref} = 1,5\%$) e antraceno ($\phi_f^{ref} = 20,0\%$) como referência, em metanol. Os valores de rendimento quântico foram determinados pela seguinte equação:

$$\phi_f = \phi_f^{ref} \cdot \frac{\int F(\lambda) d\lambda}{\int F_{ref}(\lambda) d\lambda} \cdot \frac{f_{ref}}{f} \cdot \frac{n^2}{n_{ref}^2} \quad (1)$$

Sendo: ϕ_f = rendimento quântico

$F(\lambda)$ = intensidade de emissão fluorescente

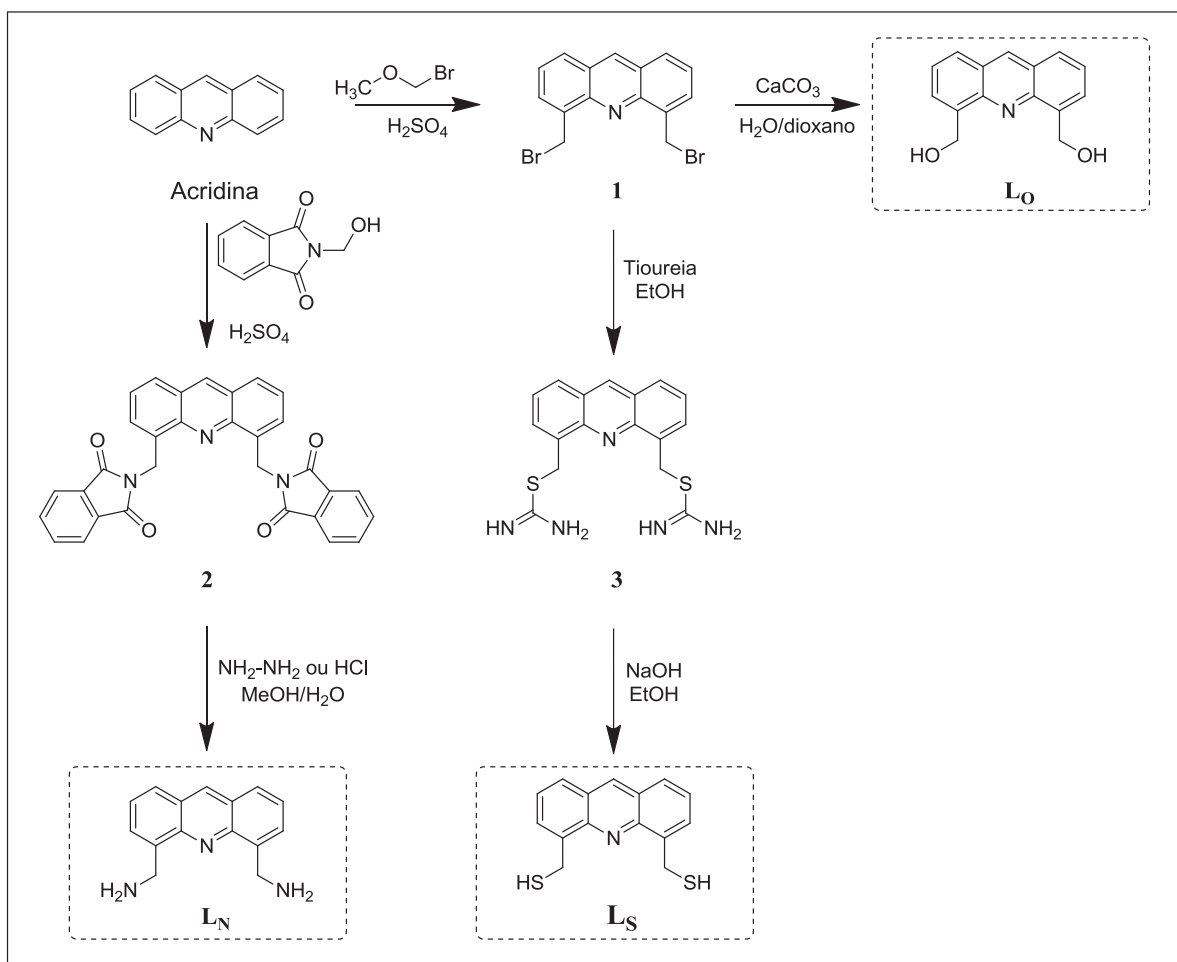
f = quantidade de luz absorvida no comprimento de onda de excitação e descrita como $f = 1 - 10^{-A(\lambda_{ex})}$, onde A corresponde a Absorbância.

n = índice de refração do solvente

3.4. Metodologia

3.4.1. Síntese dos ligantes

Os precursores (**1**, **2** e **3**) e os sensores (**L_O**, **L_N**) derivados da acridina foram sintetizados a partir de procedimentos descritos na literatura^{35–37}. A hidrólise do precursor **3** para obtenção do sensor **L_S** foi realizada em meio básico com sucesso, obtendo assim um sensor ainda inédito na literatura. As sínteses realizadas encontram-se representadas no Esquema 3.



Esquema 3: Rota sintética dos sensores derivados da acridina.

3.4.1.1. Precursor 4,5-Bis(bromometil)acridina (1)

A síntese do composto **1** foi realizada conforme adaptação da metodologia descrita por Chiron e Galy³⁸.

Em um balão de Schlenk foi adicionada acridina (2,00 g; 11,16 mmol) em 25 mL de ácido sulfúrico concentrado, gerando uma solução amarela intensamente fluorescente. Esta solução foi agitada e submetida a cinco ciclos de vácuo e injeção de argônio. Esta solução foi resfriada em um banho de gelo, e sob fluxo de argônio adicionou-se 4,00 mL bromometil-metil-éter (6,12 g; 49 mmol) formando imediatamente uma solução levemente alaranjada. O balão foi conectado ao condensador e o sistema foi aquecido a 50 °C sob agitação magnética. Na primeira hora de reação observou-se a mudança de cor para uma solução fortemente alaranjada e o início da formação de uma segunda fase vermelho-sangue e liberação de um gás alaranjado, provavelmente Br₂ gerado em função do meio extremamente oxidante. A reação foi mantida por 12 horas e resfriada até a temperatura ambiente. A solução resultante foi vertida sobre 80 g de gelo picado formando uma suspensão de um sólido amarelo-escuro que foi mantida sob agitação por 1 hora. O sólido foi isolado por filtração a vácuo, seco sob vácuo e dissolvido em CHCl₃. A solução amarela foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob vácuo resultando num sólido fino amarelo que foi lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 3,23 g (83,0%).

3.4.1.2. Síntese do precursor 4,5-Bis(*N*-ftalimetil)acridina (2)

O precursor **2** foi sintetizado utilizando as metodologias de Hess e Stwert³⁵ e de Laronze-Cochard e colaboradores³⁶.

Em um balão contendo 10 mL de ácido sulfúrico concentrado adicionou-se pequenas porções de *N*-hidroxiftalimida (3,54 g; 2 mmol) até a completa dissolução do sólido resultando numa solução viscosa levemente amarelada. Nesta solução foi adicionada gradualmente 1,8 g (1 mmol) de acridina, formando uma solução amarelo-canário que foi deixada sob agitação por 1 semana a temperatura ambiente. Após este período observou-se um escurecimento da solução para amarelo-caramelo. Esta solução foi vertida em 40 g de gelo formando uma suspensão de um sólido bege que foi mantida sob agitação por 1 hora. Esta suspensão foi tratada com NaOH até atingir pH 11, o sólido obtido foi filtrado sob

vácuo e lavado com 30 mL de água destilada e mantido sob vácuo por 3 horas o sólido resultante, ainda úmido, foi dissolvido em 250 mL de diclorometano. Esta solução foi lavada com 150 mL de solução saturada de NaCl, a fase orgânica resultante foi seca com MgSO₄ e concentrada no rotoevaporador resultando em um pó fino bege (3,15 g; 63%).

3.4.1.3. Síntese do precursor bromidrato 4,5-Bis(tioureidometil)acridina (3·HBr)

A síntese do precursor **3** foi realizada conforme proposta por Zhang e colaboradores³⁹.

Em um balão contendo 30 mL de uma solução etanólica do precursor **1** (1,00 g; 2,74 mmol), a 80 °C e sob agitação, foi adicionada 5 mL de uma solução etanólica de tiouréia (420 mg; 5,48 mol). Esta solução foi mantida sob refluxo por 16 horas formando uma suspensão fina de um sólido amarelo; esta foi concentrada a vácuo até metade do volume. O sólido foi isolado por filtração a vácuo, resultando num pó amarelo-mostarda o qual foi lavado com etanol gelado e éter etílico (630 mg; 65%).

3.4.1.4. Síntese do ligante cloridrato de 4,5-Bis(aminometil)acridina (L_N)

A 4,5-Bis(*N*-ftalimetil)acridina (**2**) foi hidrolisada por duas metodologias distintas, sendo a primeira descrita por Hess³⁵ e a segunda descrita por Laronze-Cochard e colaboradores³⁶.

Metodologia 1: Em um balão contendo 60 mL de uma solução de HCl (6 mol L⁻¹) adicionou-se a 4,5-Bis(*N*-ftalimetil)acridina (1,00 g; 2 mmol) formando uma suspensão fina amarela que foi deixada sob refluxo por 24 horas. Essa suspensão foi filtrada e o sólido fino e amarelo obtido foi lavado com metanol e éter etílico e seco sob vácuo (450 mg; 72%).

Metodologia 2: Em um balão contendo uma suspensão metanólica (100 mL) da 4,5-Bis(*N*-ftalimetil)acridina foi adicionada 5 mL de uma solução aquosa de hidrazina hidratada (≈ 88,4 mmol). A mistura foi agitada a temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio, por 24 horas. A solução amarela obtida foi concentrada em rotoevaporador, resultando em um óleo avermelhado, que foi lavado com 150 mL de diclorometano (3 x 50 mL). A fase orgânica da lavagem foi lavada com 30 mL de uma solução aquosa de NaOH 1,0 mol/L, seca com MgSO₄ e concentrada no rotoevaporador, produzindo um óleo

amarelo. Este óleo foi dissolvido em 15 mL de metanol e adicionou-se 2 mL de uma solução metanólica saturada de HCl, levando a precipitação de um sólido amarelo brilhante. Este sólido foi filtrado e lavado com 10 mL de metanol e 10 mL de éter etílico (165 mg; 27%).

3.4.1.5. Síntese do ligante 4,5-Bis(hidroxiometil)acridina (L_O)

O ligante L_O foi sintetizado utilizando metodologia descrita por Chiron e Galy³⁸ e purificado conforme descrição de Di Giorgio e colaboradores³⁷.

Em um balão de Schlenk, sob atmosfera de argônio, foram adicionados 40 mL de uma solução do precursor **1** (1,00 g; 2,47 mmol) em uma mistura (1:1) de água/dioxano e CaCO_3 (1,37 g; 14,0 mmol), formando uma suspensão fina, que foi mantida por 4 horas em refluxo a 120 °C. Após este período a suspensão foi resfriada e o sólido (CaCO_3) foi removido por filtração. O sobrenadante foi extraído com diclorometano (3x50 mL). As fases orgânicas foram misturadas, lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, secas com MgSO_4 e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto (720 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (0,030-200 mm 60A), utilizando uma mistura 1:1 de CH_2Cl_2 /acetato de etila como fase móvel, resultando em um sólido amarelo pálido (432 mg; 73%).

3.4.1.6. Síntese do ligante 4,5-Bis(hidrogenotiometil)acridina (L_S)

O ligante L_S foi sintetizado por hidrólise, em meio básico, da função química tioureída, uma rota clássica na obtenção de grupos tióis em moléculas orgânicas^{40,41}.

O precursor **3** (400 mg; 0,77 mmol) foi solubilizado em 30 mL de etanol e a esta solução adicionou-se 5 mL de uma solução etanólica de NaOH. A mistura ficou sob refluxo por 4 horas. Após, o volume da solução foi reduzido sob vácuo até cerca de 10 mL, precipitando um sólido amarelo-claro que foi isolado por filtração. Este sólido foi lavado com etanol gelado e seco sob vácuo, resultando em um pó amarelo pálido (180 mg; 84%).

3.4.2. Determinação do pK_a do Ligante L_N

Foram tituladas soluções aquosas dos sensores em concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando soluções de KOH e HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para o controle do pH, na presença de KCl ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) para manter a força iônica. As medidas de pH foram realizadas usando um eletrodo de vidro combinado, acoplado a um medidor de pH marca Luton modelo PH-221 e eletrodo PHOX modelo G10. O ponto de inflexão da curva de pH *versus* volume de titulante fornece o volume correspondente ao ponto de equivalência. Por definição, o pK_a é numericamente igual ao pH quando a razão $[L_N]/[HL_N]^+ = 1$, e, portanto, é numericamente igual ao valor de pH correspondente à metade do volume do ponto de inflexão.

3.4.3. Preparo de Solução Tampão Tris-HCl-KOH

A solução foi preparada com a adição de 7,88 g (0,05 mol) de cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano (*Tris-HCl*) em 300 mL de água ultrapura até completa solubilização. A esta solução adicionou-se uma solução saturada de KOH em água ultrapura até o pH chegar em 8,20. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico onde o volume foi levado a 500 mL com água. Esta solução foi armazenada e utilizada dentro do prazo máximo de uma semana nos ensaios de sensibilidade dos sensores aos cátions.

3.4.4. Avaliação de sensibilidade dos sensores frente a presença de diferentes cátions em solução

Para estes experimentos foram preparadas soluções equimolares contendo o sensor e cátion. Em um balão volumétrico de 5 mL adicionou-se 100 μL de solução aquosa (5 mmol L^{-1}) do sensor (no caso do sensor L_O utilizou-se DMSO em função deste não se solubilizar em água) e 50 μL de solução aquosa ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) com os respectivos sais e a mistura foi levada até o volume final de 5,0 mL com uma solução tampão (Tris-HCl-KOH, pH = 8,20). As concentrações finais do ligante e do cátion são de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esta solução foi analisada por espectroscopia de emissão, usando como comprimento de

excitação 355 nm, com *slit* de excitação e emissão iguais a 3 e 10 nm, respectivamente. Para cada cátion avaliado, as medidas obtidas foram realizadas em triplicatas.

3.4.5. Determinação de estequiometria dos complexos formados em solução

Para esta finalidade empregou-se a metodologia de Job ou o método das Variações Contínuas. É a forma mais popular de determinar a estequiometria dos complexos. Supõe-se que o complexo $[M_mL_n]$ (onde M é a espécie metálica e L o ligante) é o único a ser formado em solução e, portanto, o único responsável pela variação de uma propriedade como absorvância, intensidade de emissão ou deslocamento químico, por exemplo. No gráfico onde monitora-se várias razões molares de L_0/M_0 sem alterar a concentração total dos reagentes, ou seja, $[L] + [M] = \text{constante}$, espera-se encontrar o seu máximo ou mínimo da variação da propriedade monitorada para uma solução onde a razão $[L]:[M] = n:m$.

Desta forma preparou-se duas soluções $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (50 mL) do ligante e do metal e a partir da mistura destas em diferentes proporções de forma que o volume final sempre fosse igual a 5,0 mL. Estas soluções foram monitoradas por fluorescência no comprimento de onda do máximo de emissão. Com base nestes dados registrou-se uma curva da variação da intensidade de emissão fluorescente ($\Delta F_{\text{emissão}}$) em função da razão molar com a finalidade de obter-se a estequiometria do complexo formado em solução.

3.4.6. Determinação das constantes de estabilidade e de supressão dos complexos formados em solução

A constante de formação dos complexos foi determinada através da abordagem descrita por Benesi-Hildebrand, metodologia bastante difundida na literatura, nela correlaciona-se a intensidade de emissão do sensor com a concentração do agente supressor ou intensificador (os cátions, neste trabalho) da mesma através da seguinte equação^{42,43}:

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{(F_\infty - F_0) K [M]^x} + \frac{1}{F_\infty - F_0} \quad (2)$$

Sendo: F = Intensidade de emissão na presença do analito

F_0 = Intensidade de emissão na ausência do analito

K = Constante de formação do complexo

$[M]$ = concentração do agente supressor ou intensificador de fluorescência; neste trabalho, em sua maioria são cátions de íons metálicos.

Os efeitos de supressão de fluorescência são comumente descritos através do formalismo de Stern-Volmer⁴⁴:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [M]_0^x = 1 + K_{SV} [M]_0^x \quad (3)$$

Sendo: F = Intensidade de emissão na presença do analito

F_0 = Intensidade de emissão na ausência do analito

k_q = Constante cinética bimolecular de supressão (associada a eficiência do agente supressor)

τ_0 = Tempo de vida do estado excitado na ausência do supressor

K_{SV} = Constante termodinâmica de formação do complexo (associada à afinidade metal-ligante)

x = Razão m:n determinada pelo método de Job

$[M]$ = Concentração do agente supressor de fluorescência

3.4.7. Estimativa das figuras de mérito e validação do uso dos ligantes como metodologia analítica na determinação dos cátions de interesse

Para a determinação das figuras de mérito foram fixados parâmetros mostrados na Tabela 1, tidos como condição nominal de análise.

Tabela 1: Parâmetros nominais da metodologia analítica proposta.

Parâmetros Nominais	
Slit de excitação	1,5 mm
Slit de emissão	3,0 mm
Velocidade de varredura	Rápida (250 nm min ⁻¹)
Comprimento de onda monitorado	450 nm
Temperatura	25 °C
pH	8,20 (Tampão Tris-HCl-KOH; 0,01 mol L ⁻¹)
Atmosfera de argônio	Não
Armazenagem após preparo das amostras	18 horas, em temperatura ambiente

Para estimativa dos valores dos Limites de detecção (*LOD*), Limites de quantificação (*LOQ*), Faixa de resposta Linear e Sensibilidade (*S*) construiu-se uma curva analítica com todos os pontos em triplicata.

A faixa de resposta linear foi obtida até que o coeficiente de determinação (R^2) fosse superior a 0,990 quando aplicada uma Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados indicando a melhor adequação ao modelo aplicado onde $F = F_0 + S * c_A$, onde F corresponde a intensidade de emissão, S é a sensibilidade analítica, representada pela inclinação da reta, e c_A é a concentração do analito.

Os valores de *LOD* e *LOQ* foram estimados pelas Equações (1)⁴⁵:

$$LOD = 3 * \frac{S_{Branco}}{S} \quad (4)$$

$$LOQ = 10 * \frac{S_{Branco}}{S} \quad (5)$$

Sendo que σ_{Branco} é a estimativa de desvio padrão da prova em branco (N = número de replicatas =10) calculado pela seguinte equação $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$ (6), onde x corresponde aos valores de intensidade de emissão, \bar{x} a média destes valores e N o número de amostras analisadas e S à sensibilidade analítica ou a inclinação da curva.

O valor de *LOQ* foi verificado com dez replicatas. O valor mínimo da faixa de resposta linear é igual ao *LOQ* e o valor máximo é dado pelo último ponto considerado para a regressão.

Para avaliar quanto exatidão da metodologia foram usados os testes de recuperação através da equação (9), contudo em função da falta de Material de Referência Certificado, o ideal seria comparar os valores obtidos no teste com o obtido por metodologias analíticas oficiais como ICP-OES e Voltametria cíclica com eletrodo gotejante de Mercúrio no caso da determinação do íon Zn^{2+} em matriz aquosa.

$$\text{Recuperação} = \frac{c_{A \text{ Experimental}} * 100\%}{c_{A \text{ Teórica}}} \quad (7)$$

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária. Para obtenção da primeira foram analisados dois níveis de concentração ($2,0 \times 10^{-4}$ e $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com dez replicatas, monitorados em três períodos de tempo distintos após o preparo das amostras (16, 20 e 24 horas) em um mesmo equipamento. Para o ensaio precisão intermediária monitorou-se apenas um nível de concentração preparado por dois analistas distintos num mesmo equipamento. O ensaio de reprodutibilidade, que são realizados por testes interlaboratoriais, não foi realizado em razão da grande diferença no sinal obtido pelos detectores dos equipamentos presentes na UFPR e UTFPR.

O ensaio de robustez foi realizado através do teste de Youden^{46,47}, variando por um planejamento fatorial sete parâmetros nominais conjuntamente, em duplicata, conforme mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Condições nominais e variadas no teste de Youden.

	Parâmetro	Condição	
		Nominal (+)	Variada (-)
1	Armazenamento	Temperatura ambiente	Geladeira (~5° C)
2	Água	Ultrapura	Destilada
3	pH	8,2	7,8
4	Tempo	18 horas	24 horas
5	Borbulhamento de Argônio	Não	Sim
6	Concentração do tampão	0,10 mol L ⁻¹	0,08 mol L ⁻¹
7	Temperatura	~25 °C	~15°C

Os sete parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em oito ensaios. Assim, oito amostras foram analisadas com o objetivo de determinar a influência de cada parâmetro no resultado final da medida. Os sete parâmetros nominais empregados, bem como as variações são demonstrados na Tabela 2 e a Tabela 3 mostra a combinação

fatorial dos parâmetros usados em cada teste. Os sinais positivo (+) e negativo (-) na Tabela 3 indicam o uso das condições “nominais” ou “variadas”. Por exemplo, as amostras relativas à combinação C1 foram medidas nas condições nominais definidas. Já as amostras relativas à combinação C2 foram preparadas variando os parâmetros 3, 5, 6 e 7 e mantendo os parâmetros 1, 2 e 4.

Tabela 3: Combinações fatoriais usadas no teste de Youden.

Combinação Fatorial	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
1	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+	+	-	-
3	+	-	+	-	+	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	+	+
5	+	-	+	-	-	+	-	+
6	+	-	-	+	+	-	-	+
7	+	-	-	+	-	+	+	-

(+) = condição nominal usada; (-) = condição variada usada

Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média dos quatro valores correspondendo às condições nominais (assinalados com “+”) foi comparada com a média dos quatro valores correspondentes às condições variadas (assinalado com “-”). Por exemplo, para avaliar o efeito da temperatura no resultado final das análises, a seguinte equação foi empregada:

$$Efeito da Temperatura = \frac{C1 + C4 + C6 + C7}{4} - \frac{C2 + C3 + C5 + C8}{4} \quad (8)$$

A linha de significância foi estimada através da Equação, valores de Efeito superiores a mesma foram reprovados neste teste. Ou seja antes deste parâmetro ser variando em uma futura análise seus efeitos deverão ser estudados, pois os mesmos afetam de forma significativa a medida tendo de ser monitorados de forma mais rigorosa que os demais efeitos monitorados no teste.

$$Limite de significancia = \frac{\sum_{n=1}^8 S_n * t_{critico}}{N} \quad (9)$$

Sendo s_n o desvio padrão da combinação fatorial n ; N o número de combinações fatoriais usadas e $t_{\text{crítico}}$ o valor de t para de Student para uma distribuição normal de uma calda (não direcional) pra um nível de significância de 95% para amostras de tamanho N no caso de 8 combinações fatoriais o $t_{\text{Crítico}}=2,3060$

3.4.8. Determinação de possíveis interferentes

Nesta avaliação foram escolhidos diferentes íons que poderiam estar presentes em amostras reais. Foram testadas condições onde os possíveis interferentes encontram-se em condições equimolares ao analito de interesse, em ensaios de competição. Alterações inferiores ou iguais a 5% na variação das intensidades de emissão em relação a amostra de referência (L_N $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e Zn^{2+} $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) foram desconsideradas como interferência.

3.4.9. Aplicação do método em amostras reais

As amostras de água de diferentes origens foram analisadas. Água destilada e água potável (da torneira) foram recolhidas no próprio laboratório, as amostras de água mineral marca “A”, sem gás de uma e do fertilizante marca “B”, com o íon Zn^{2+} em sua composição de obtida no comércio local. A amostra do fertilizante continha um sal do cátion para o qual o sensor demonstrou uma melhor seletividade com a finalidade de observar o comportamento do sensor numa amostra mais complexa. A preparação das amostras foi feita da seguinte forma: em um balão volumétrico adicionou-se 100 μL de uma solução estoque do sensor ($0,005$ mol L^{-1}), 1,0 mL do tampão TRIS (pH=8,2; $1,00$ mol L^{-1}) e 1,00 mL da amostra de água (50 μL no caso do fertilizante líquido) e então o volume foi levado a 5,00 mL com água ultrapura. Para o ensaio de recuperação ainda se adicionou uma alíquota de 100 μL de uma solução do cloreto do cátion cujo sensor mostrou melhor seletividade ($0,01$ mol L^{-1}). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do ligantes

Os precursores **1**, **2**, **3** e os sensores/ligantes **L_N**, **L_O** e **L_S** foram caracterizados por análise elementar, espectrometria de massa e técnicas espectroscópicas (FTIR, NMR de ¹H, ¹³C e DEPT-135 e UV-vis). Como os precursores **1**, **2** e **3** já apresentam sua síntese e caracterização bem estabelecidos na literatura alguns resultados de caracterização referentes aos mesmos não serão apresentados.

4.1.1. Análise Elementar

Os resultados da análise elementar dos precursores e dos sensores estão listados na Tabela 4. Os valores experimentais se encontram próximos dos valores calculados, validando as composições propostas. O precursor **3** foi isolado na forma de seu bromidrato correspondente e o ligante **L_N** = 4,5-Bis(aminometil)acridina encontra-se na forma de cloridrato com os dois grupos amino protonados. O ligante **L_S** encontra-se na forma de tiolato de sódio.

Tabela 4: Valores experimentais e calculados para os ligantes **L_N**, **L_O** e **L_S**.

Composto	Massa molar (g mol ⁻¹)	Formula Molecular	Resultado	C%	H%	N%
Precursor 1	389,94	C ₁₅ H ₁₁ NBr ₂ · 3/2 H ₂ O	Calculado	45,95	3,60	3,57
			Experimental	45,64	3,20	3,57
Precursor 2	551,55	C ₃₁ H ₁₉ O ₄ N ₃ ·3 H ₂ O	Calculado	67,51	4,57	7,62
			Experimental	67,10	4,38	7,64
Precursor 3	517,30	C ₁₇ H ₁₇ N ₅ S ₂ · 2 HBr	Calculado	39,47	3,70	13,05
			Experimental	39,50	3,61	13,02
L_N ·2 HCl· 2/3 H ₂ O	311,08	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ ·2 HCl · 2/3 H ₂ O	Calculado	53,42	5,86	12,46
			Experimental	53,58	5,85	12,19
L_O ·1/5 H ₂ O	242,88	C ₁₅ H ₁₃ NO ₂ · 1/5 H ₂ O	Calculado	74,18	5,56	5,77
			Experimental	74,34	5,59	5,74
L_S ·1/3 H ₂ O	279,38	C ₁₅ H ₁₂ NNaS ₂ ·1/3 H ₂ O	Calculado	60,18	4,26	4,68
			Experimental	60,09	4,14	4,99

4.1.2. Espectroscopia vibracional (FTIR)

Os espectros vibracionais de FTIR dos compostos sintetizados encontram-se nas Figuras 8, 9 e 10 e as atribuições tentativas das principais bandas dos espectros encontram-se na Tabela 5.

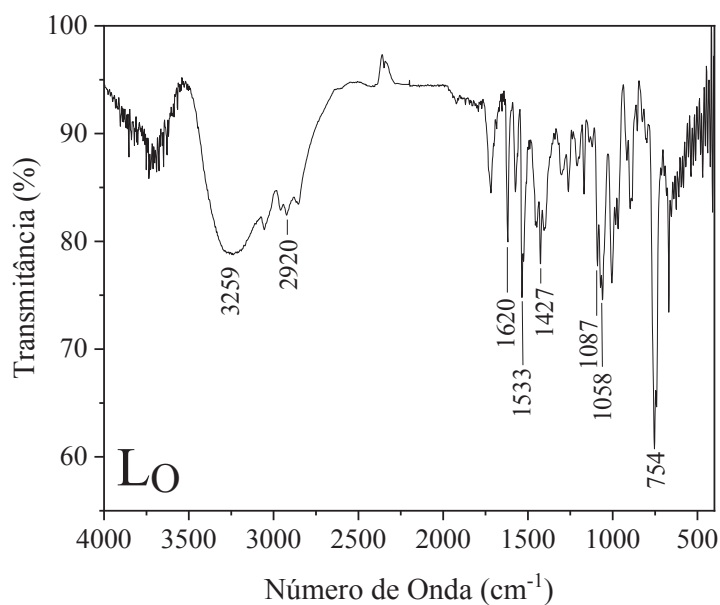


Figura 8: Espectro vibracional FTIR do ligante L_O em pastilha de KBr.

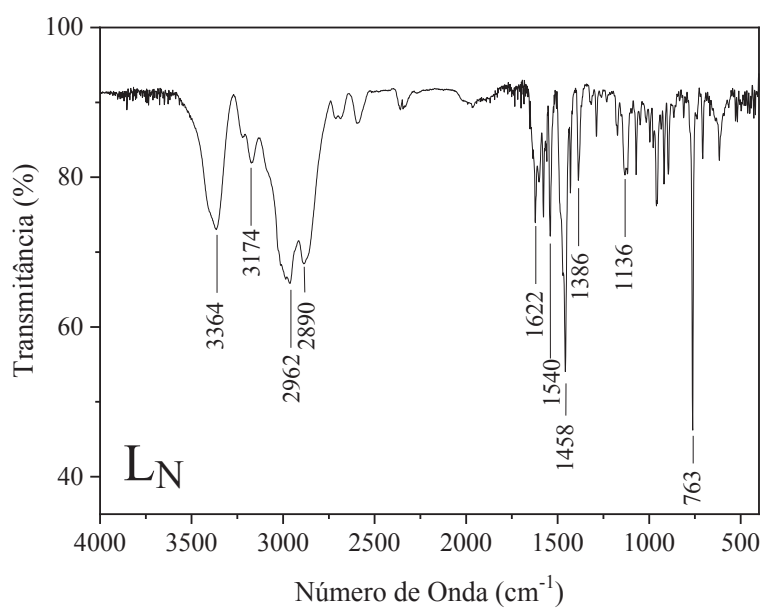


Figura 9: Espectro vibracional FTIR do ligante L_N em pastilha de KBr.

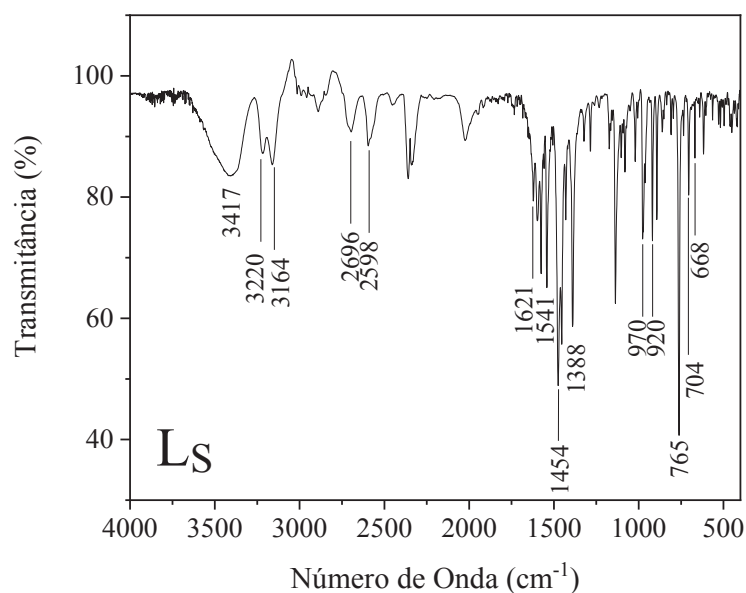


Figura 10: Espectro vibracional FTIR do ligante L_S em pastilha de KBr.

Tabela 5: Atribuição tentativa das principais bandas dos espectros FTIR dos ligantes L_N , L_O e L_S .

Composto	Número de onda (cm^{-1})			Modo vibracional
	Ligante L_N	Ligante L_O	Ligante L_S	
	3364	-	-	$\nu(\text{N-H})$
	-	3259	3417	$\nu(\text{O-H})$
	-	-	2598	$\nu(\text{S-H})$
	3174, 2962	2920	3164, 3220	$\nu(\text{C-H})_{\text{sim}}$ e $\nu(\text{C-H})_{\text{as}}$
	1622	1620	1621	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{aromático}}$
	1540	1533	1541	$\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{aromático}}$
	1386 e 1458	1427	1388 e 1454	$\delta(\text{C}=\text{C})_{\text{as}}$
	1136	1087	970	$\nu(\text{C-R})$
	763	754	765	$\pi(\text{C}=\text{C})_{\text{as}}$

Onde R = NH_3 , para o Ligante L_N , OH para o Ligante L_O e SH para o Ligante L_S .

Os espectros são bastante parecidos na região abaixo de 2500 cm^{-1} , nessa região é possível observar bandas atribuídas aos modos de deformação angular do anel N -heterocíclico fora do plano $\pi(\text{C}=\text{C})_{\text{as}}$ (765 cm^{-1}), deformação angular no plano $\delta(\text{C}=\text{C})_{\text{as}}$ (1386 cm^{-1}) do anel heterociclo e estiramentos $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{aromático}}$ (1621 cm^{-1}) e $\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{aromático}}$ ($\approx 1540 \text{ cm}^{-1}$), caracterizando a presença da acridina na estrutura dos

compostos. As funções químicas -OH e -NH₂ foram confirmadas pela presença de bandas referentes aos estiramentos $\nu(\text{O-H})$ e $\nu(\text{N-H})$ na região acima de 3000 cm⁻¹ e $\nu(\text{S-H})$ 2598 cm⁻¹. O estiramento $\nu(\text{C}_{\text{alifático}}-\text{R})$ aparece em 1136, 1087 e 970 cm⁻¹ ⁴⁸. Esta banda $\nu(\text{C-R})$ aparece bastante deslocada para menor energia no ligante L_S devido à grande diferença de massa do grupo tiol quando comparado aos substituintes amino e hidroxila. A presença de uma banda em 3417 cm⁻¹ na região de hidroxilas, indica a presença da água de hidratação no sólido, como proposto pela análise elementar.

4.1.3. Espectrometria de Massas

No espectro de massas ESI(+) do ligante L_N, mostrado na Figura 11, é possível observar a presença de um pico em $m/z = 283,14$ coerente com o protonação do ligante, $[\text{L}_\text{N}-\text{H}]^+$.

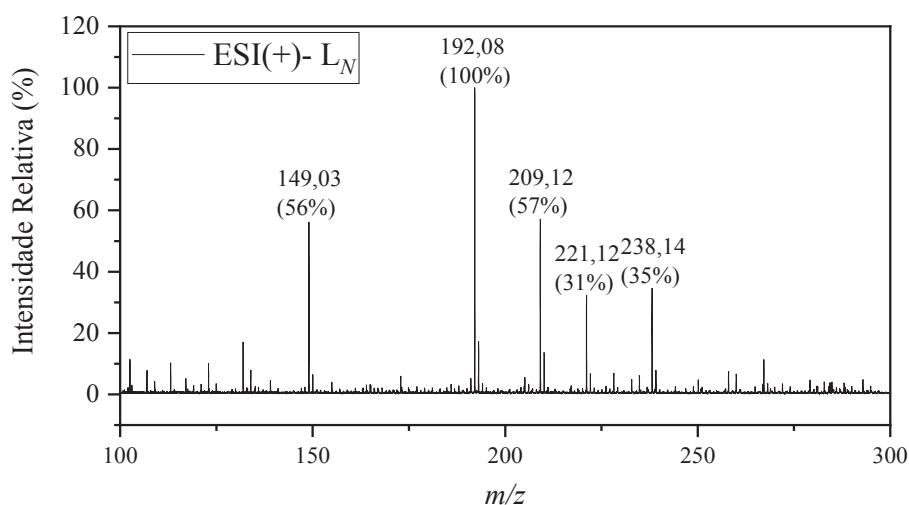


Figura 11: Espectro de Massas ESI (+) do ligante L_N.

O pico base em $m/z = 192,08$ refere-se à perda das duas aminas e um metileno formando um cátion que se estabiliza por efeito ressonante, fazendo com que esta espécie seja a que apresenta maior abundância relativa entre as geradas pela ionização. As atribuições dos principais picos em $m/z = 238,14$ (ion molecular); 221,12; 209,12; 192,08 (pico base) e 149,11, estão ilustradas na Figura 12.

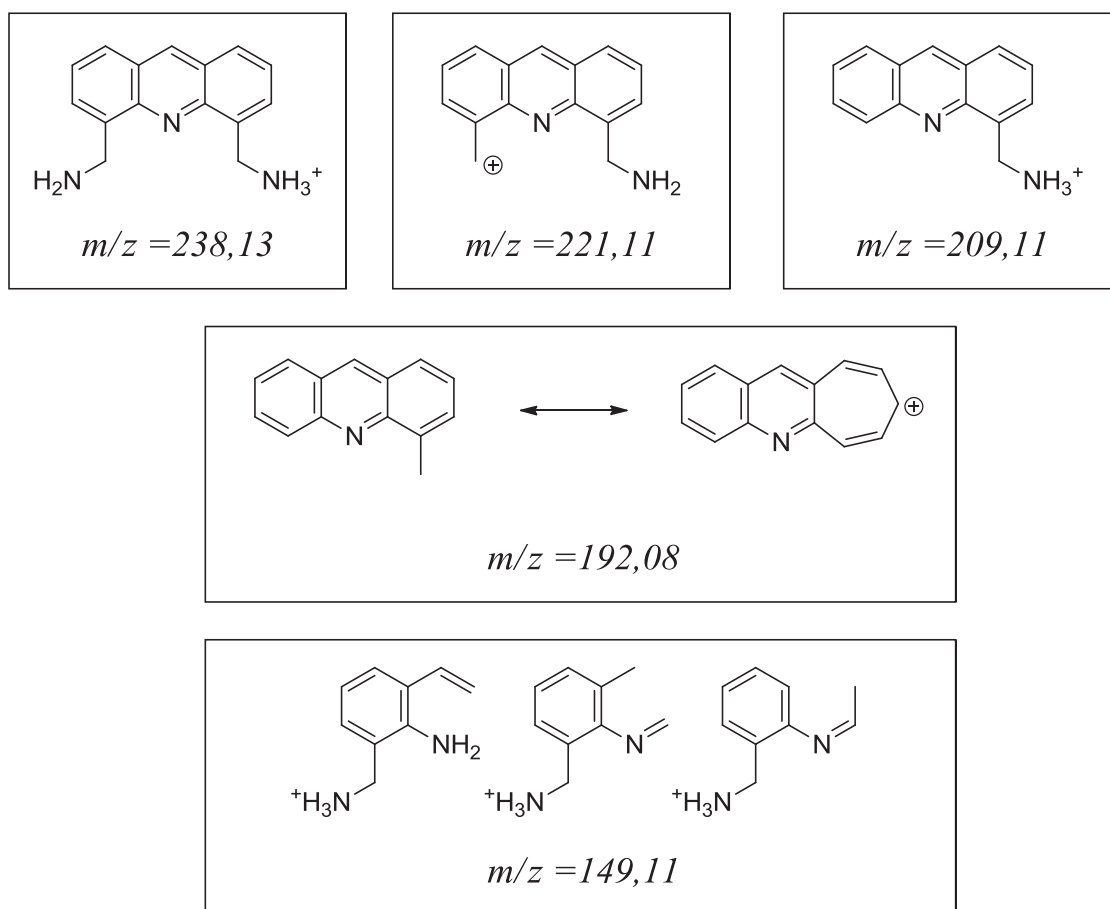


Figura 12: Representação das espécies atribuídas aos principais picos do espectro.

Os espectros simulados considerando-se as distribuições isotópicas dos fragmentos atribuídos aos picos base e do íon molecular estão mostrados na Figura 13, onde foi possível observar a concordância com os espectros experimentais, corroborando com a proposta de atribuição dos picos.

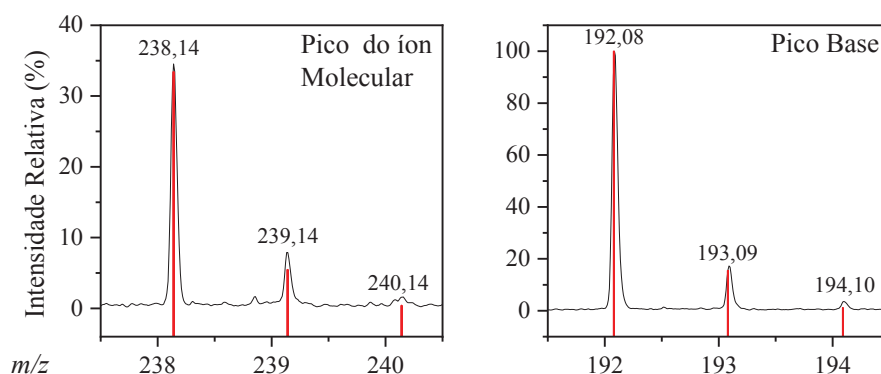


Figura 13: Ampliação do conjunto de picos (preto) e simulação considerando-se as distribuições isotópicas (vermelho) dos principais picos para os fragmentos observados no espectro do ligante L_N .

Na Figura 14 é mostrado o espectro de massas ESI(+) do ligante L_O , nele é possível observar o pico mais intenso, do íon molecular em $m/z = 240,09$, ao qual foi atribuído ao ligante protonado $[L_O-H]^+$. Estes picos encontram-se ampliados na Figura 15, junto com a simulação de seu padrão isotópico mostrando-se bastante semelhantes.

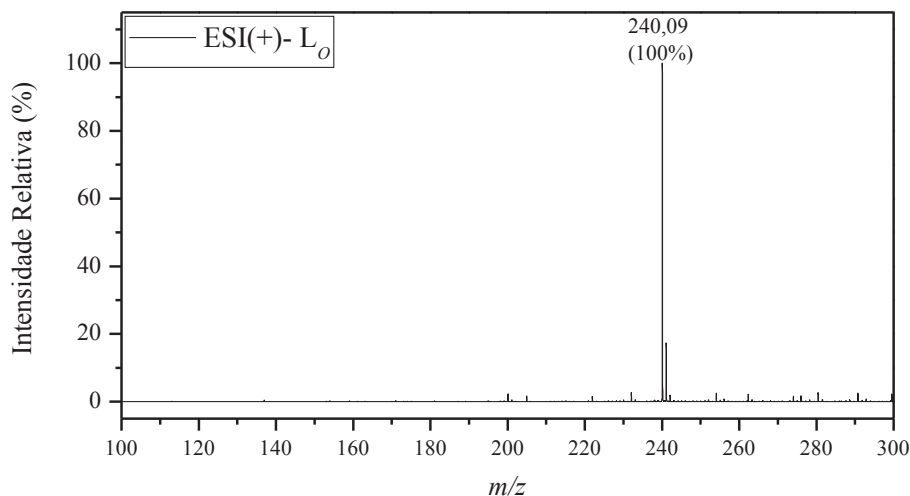


Figura 14: Espectro de Massas ESI (+) do ligante L_O .

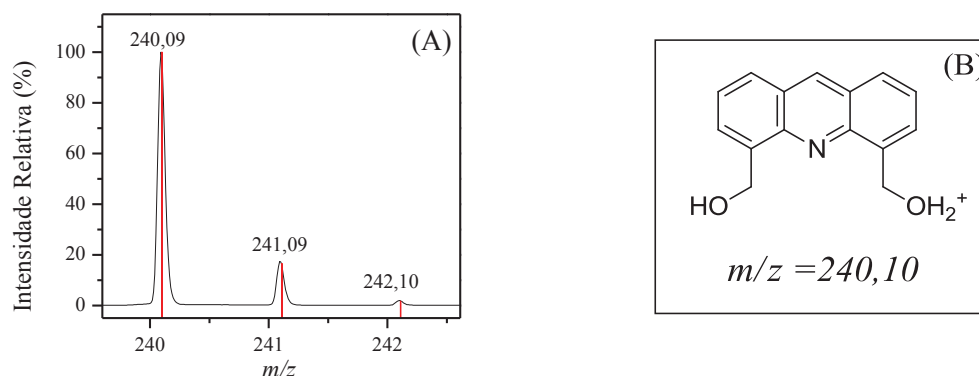


Figura 15: (A) Ampliação do conjunto de picos (preto) e simulação considerando-se as distribuições isotópicas (vermelho) dos principais picos para os fragmentos observados no espectro do ligante L_O . (B) representação do íon molecular.

O espectro de massas ESI(+) do ligante L_S , apresentado na Figura 16, mostra os picos dos íons moleculares poucos intensos em $m/z = 272,05$ e $294,95$ associados aos cátions $[L_S-H]^+$ e $[L_S-Na]^+$ respectivamente. O pico base em $m/z = 226,96$ refere-se à perda do grupo tiol e seu metileno adjacente formando um cátion que se estabiliza por efeito ressonante assim como no caso do pico base do ligante L_N . As simulações da distribuição isotópica de alguns fragmentos e atribuições dos principais picos estão ilustradas nas Figuras 17 e 18.

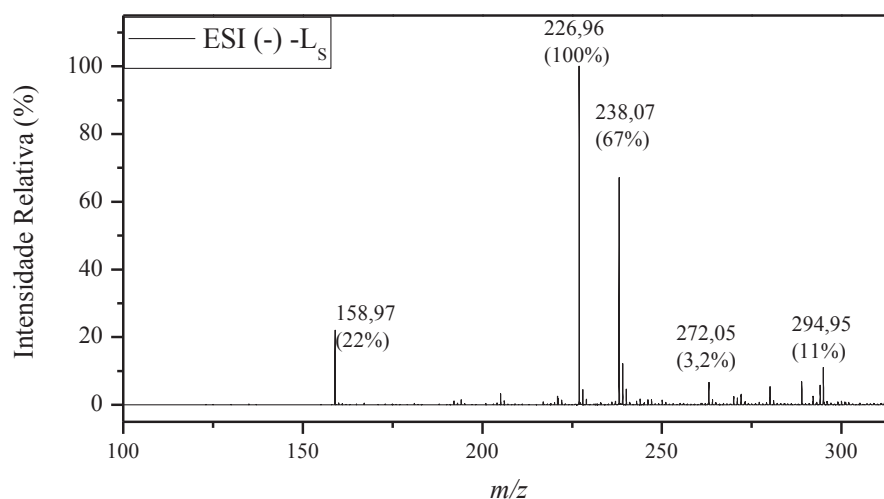


Figura 16: Espectro de Massas ESI (+) do ligante L_S .

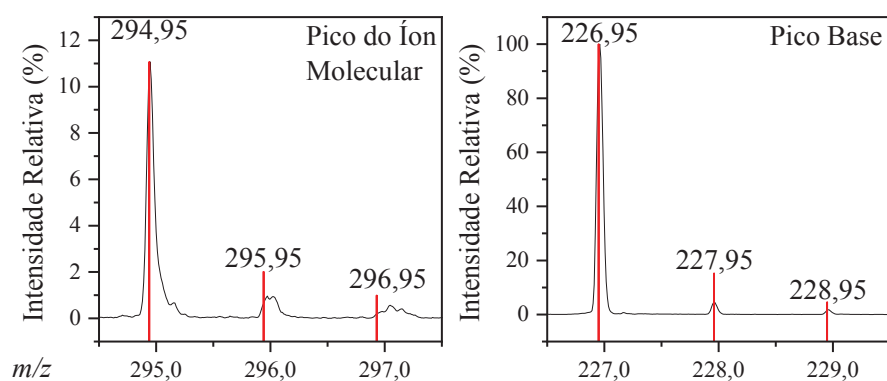


Figura 17: Ampliação do conjunto de picos (preto) e simulação da distribuição isotópica (vermelho) dos principais picos para os fragmentos observados no espectro do ligante L_S .

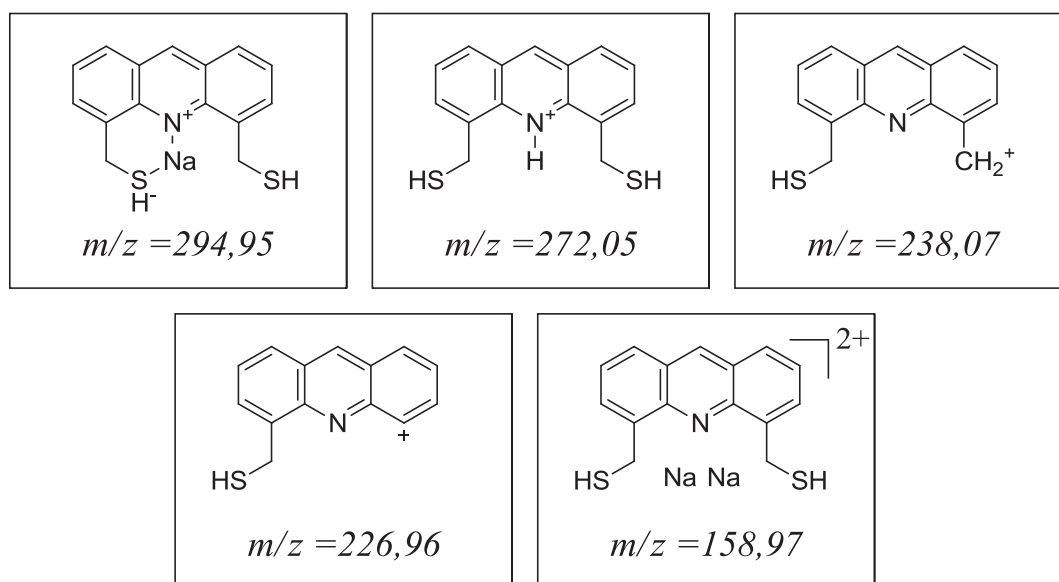


Figura 18: Representação das espécies atribuídas aos principais picos do espectro.

4.1.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

4.1.4.1. Espectroscopia de RMN do precursor cloridrato de 4,5-Bis(aminometil)acridina (L_N)

O espectro de RMN do ligante L_N foi realizado em uma mistura $D_2O+DMSO-d_6(1:1)$. Antes da medida, a amostra foi deixada por 30 minutos no ultrassom para evaporação do TMS presente como referencia interna do $DMSO-d_6$, restando apenas o DSS = (3-(trimetilsilil)-1-propanosulfonato de sódio) como referência na amostra. O espectro de 1H -RMN é mostrado na Figura 19. Os deslocamentos químicos e os valores de integração da molécula encontram-se na Tabela 6.

O sinal presente na região de menor frequência refere-se aos hidrogênios metilênicos vizinhos ao grupo amina (4,82 ppm) um pouco mais deslocado para frequências mais baixas de ressonância que o esperado para aminas primárias⁴⁸ em função da presença das nuvens eletrônicas do anel aromático na proximidade, que causa uma maior blindagem nestes núcleos, deslocando o sinal.

Não foi possível observar o sinal referente aos hidrogênios amínicos, onde esperava-se observar um sinal largo na região de 0,5 a 4,0 ppm⁴⁸. Esta ausência pode ser justificada pelo fato destes hidrogênio estarem envolvidos em ligações de hidrogênio com o solvente prótico, neste caso estes prótons são substituídos por deutério com uma alta constante de troca, em função da maior quantidade de átomos de deutério em relação ao hidrogênio neste meio, desta forma na análise de 1H -RMN não se observa o sinal proveniente dos hidrogênios do grupo amina.

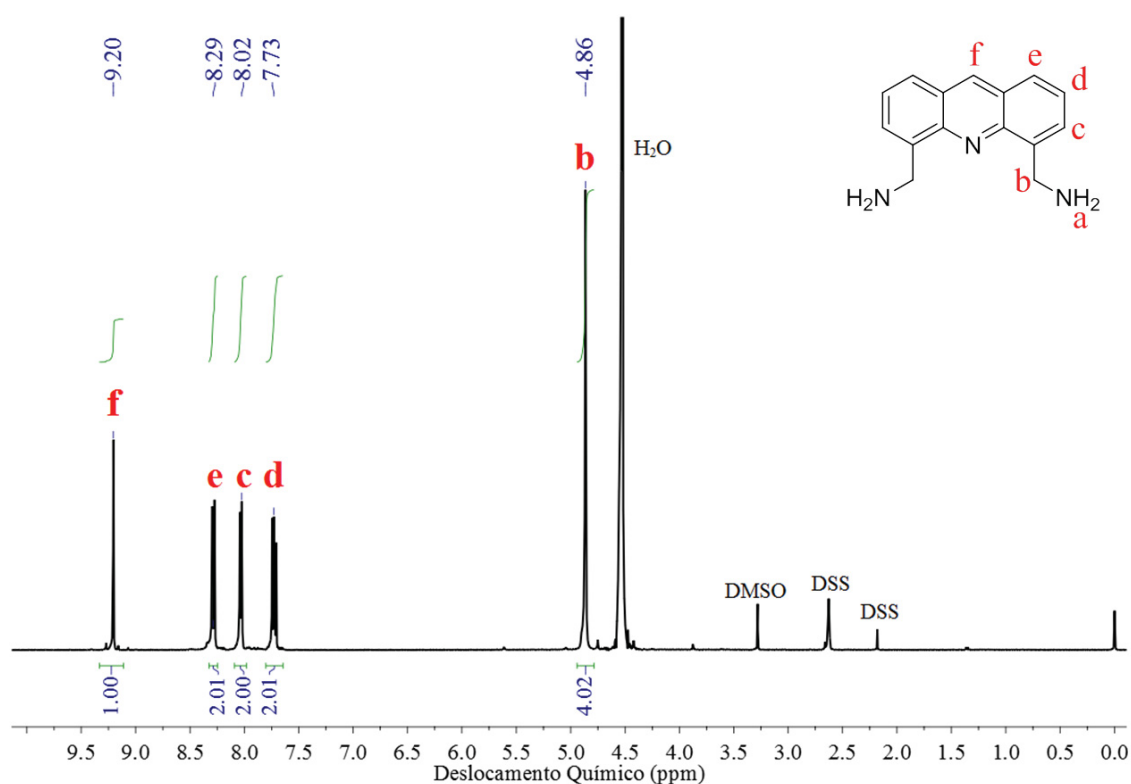
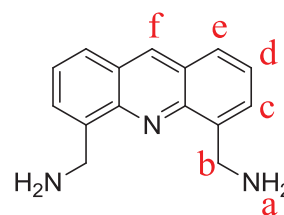


Figura 19: Espectro de ^1H -RMN do ligante L_N em uma mistura D_2O - $\text{DMSO}-d_6$ (1:1) - 200 MHz.

Tabela 6: Deslocamentos químicos e valores de integração referentes ao espectro de ^1H -RMN de L_N .

H	δ (ppm)		Multiplicidade	Integral
	Exp.	Lit. ³⁶		
a	-	-	-	-
b	4,86	4,83	Simpleto	4,02
c	8,02	8,32	Dupleto	2,00
d	7,73	8,08	Duplo dupleto	2,01
e	8,29	8,60	Dupleto	2,01
f	9,20	9,34	Simpleto	1,00



Os três sinais em 7,77, 8,03 e 8,25 ppm, como mostrado na ampliação do espectro presente na Figura 20 são provenientes da acridina na região de aromáticos. Os valores de integração destes sinais apresentam a razão 1:1:1 entre eles, o que é condizente com a estrutura esperada. As multiplicidades destes sinais (duplo dupleto, dupleto e dupleto respectivamente) juntamente com o espectro de ^1H -COSY (Figura 21) mostraram a correlação entre os núcleos que se acoplam na molécula. Assim, foi possível atribuir os desdobramentos dos sinais ao acoplamento dos hidrogênios **e** e **c**

com o **d**, justificando assim suas multiplicidades. Estes dados são condizentes com o esperado para acridinas 5,4- substituídas.

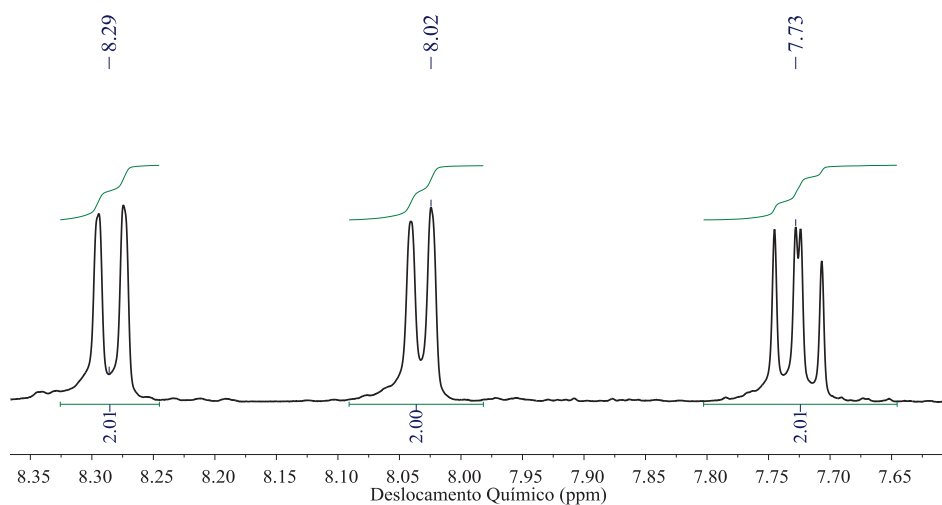


Figura 20: Ampliação da região de 7,60 a 7,80 ppm do espectro apresentado na Figura 19.

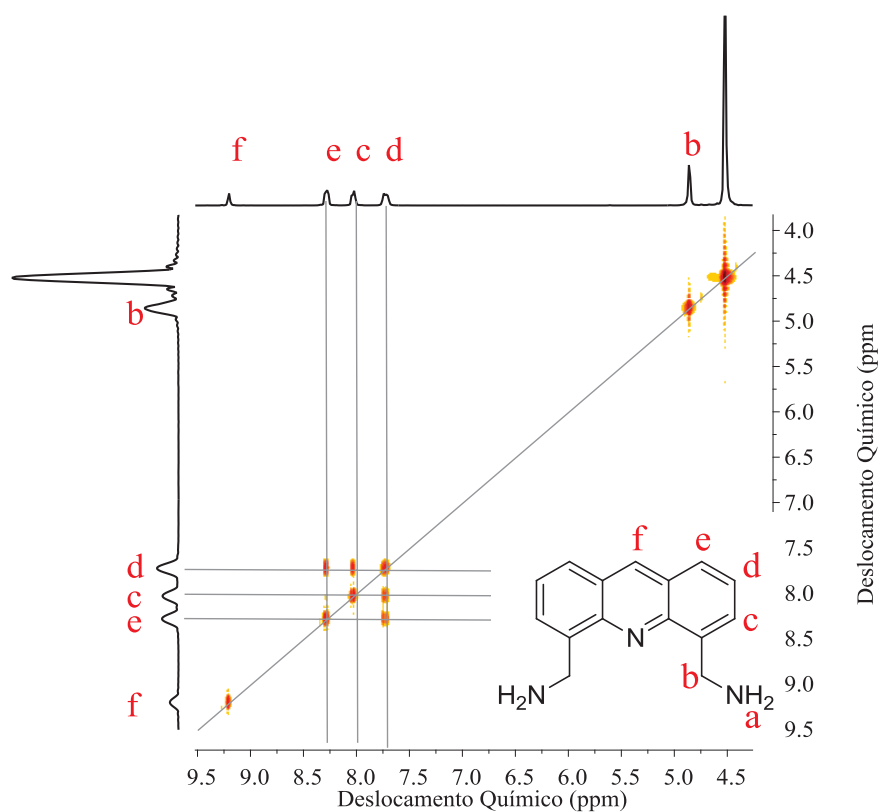


Figura 21: Espectro de ^1H -COSY do ligante L_N em uma mistura D_2O - $\text{DMSO}-d_6$ (1:1).- 400 MHz.

Os demais sinais foram atribuídos a solventes ou à referência interna, DSS. Todos os sinais encontram-se com deslocamento químicos coerentes com dados dispostos na literatura^{35–37,39}.

As Figura 22 e 23 mostram os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN e ^{13}C -DEPT-135 referentes ao ligante L_N e os deslocamentos químicos referentes aos átomos de carbono são listados na Tabela 7.

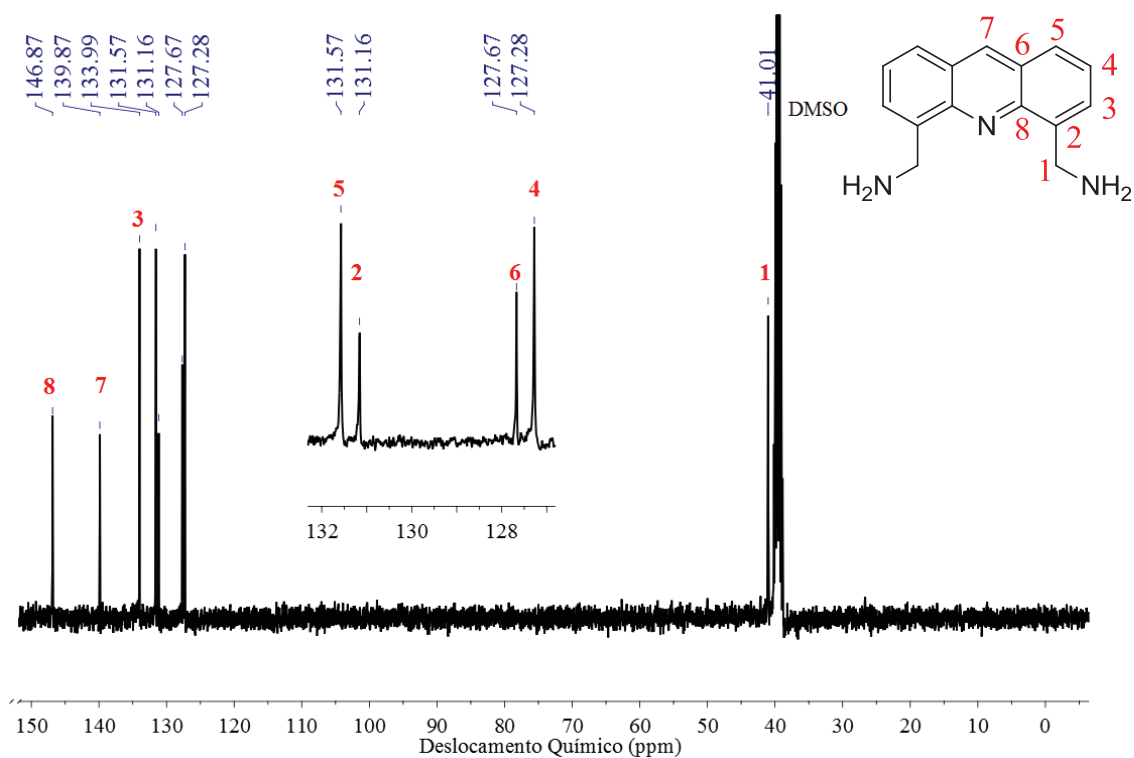


Figura 22: Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN do ligante do ligante L_N em uma mistura D_2O - $\text{DMSO}-d_6$ (1:1) – 50 MHz.

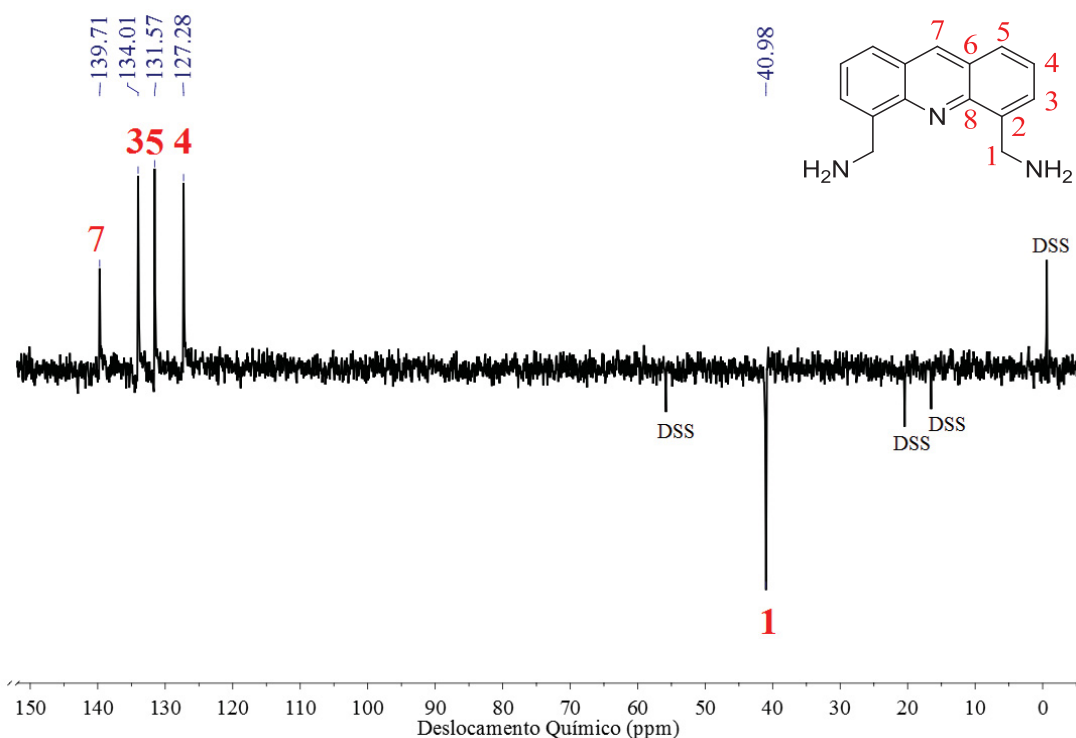
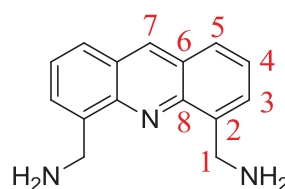


Figura 23: Espectro de DEPT-135 do ligante do ligante L_N em uma mistura D_2O - $DMSO-d_6$ (1:1) - 50 MHz.

Tabela 7: Deslocamentos químicos referentes aos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT-135 de L_N .

C	$\delta^{13}C$ -RMN (ppm)		δ DEPT-135 (ppm)
	Exp.	Lit. ³⁶	
1	41,01	44,42	40,98
2	131,16	136,60	-
3	133,99	127,31	134,01
4	127,28	126,46	127,28
5	131,57	127,05	131,57
6	127,67	125,56	-
7	139,87	141,14	139,71
8	146,87	146,50	-



O espectro de $^{13}C\{^1H\}$ -RMN apresenta o número de sinais esperados para molécula, com destaque para o sinal em 41,01 ppm que é atribuído ao carbono **1** que se encontra bastante próximo ao setipletto atribuído a um dos solventes da análise ($DMSO-d_6$). Seu deslocamento químico é levemente superior ao esperado para aminas β -aromáticas. Também é possível notar que ele é o único sinal que aparece em fase oposta (negativa) no experimento de DEPT-135, esta mudança de fase é característica de grupos $-CH_2-$ neste tipo de experimento.

O experimento de HSQC (Figura 24), correlaciona sinais de núcleos distintos que acoplam entre si como ^{13}C e ^1H . O sinal associado ao carbono **1** acopla com o sinal presente na região de 4,86 ppm (**b**), do espectro de ^1H , corroborando com esta atribuição. Os sinais referentes aos carbonos 2, 6 e 8 são pouco intensos no espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN e eles não são observados nos espectro de DEPT-135 e de ^1H -HSQC, porque os respectivos átomos de carbono não estão ligados a átomos de hidrogênio.

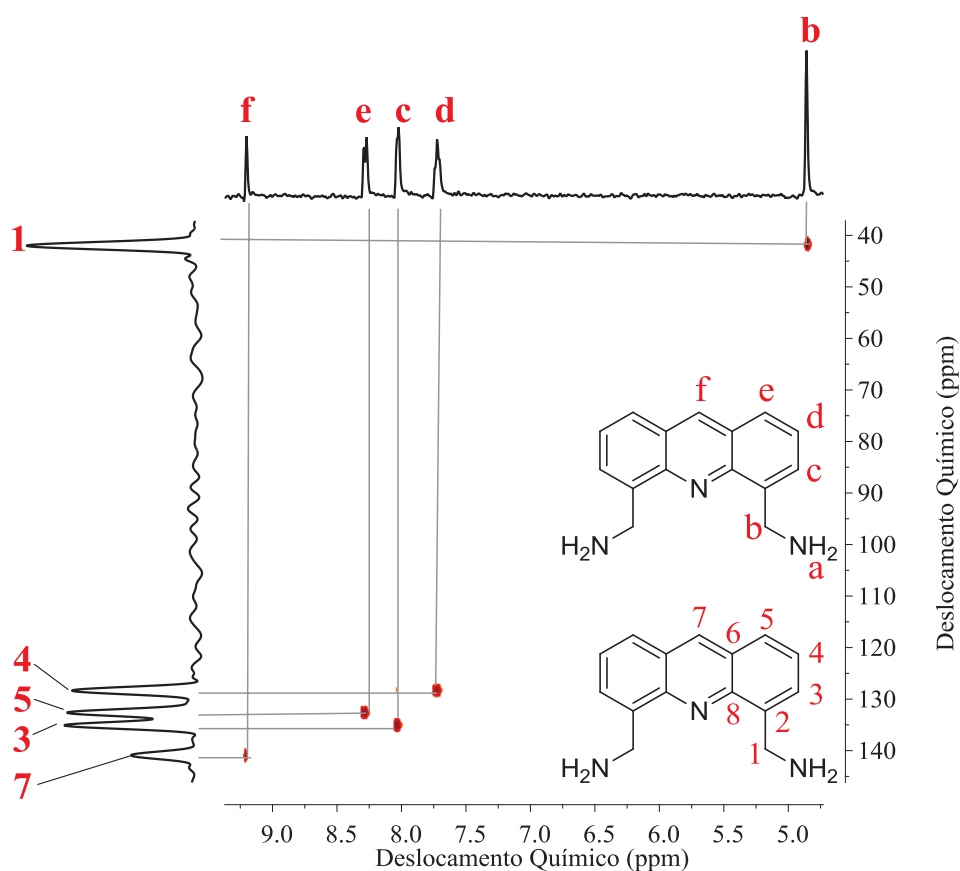


Figura 24: Espectro de ^1H -HSQC do ligante L_N em uma mistura D_2O - $\text{DMSO}-d_6(1:1)$ - 50 MHz.

O experimento de ^1H -HSQC foi importante para que fosse realizada a atribuição dos sinais presentes na região de 120 a 140 ppm do espectro de carbono. Com ele foi possível observar que os sinais atribuídos aos carbonos **4**, **5** e **7** acoplam com os sinais associados aos hidrogênios **d**, **e** e **f**, respectivamente.

4.1.4.2. Espectroscopia de RMN do ligante 4,5-Bis(hidroximetil)acridina (L_O)

O espectro de ^1H -RMN mostrado na Figura 25 do ligante Bis(hidroximetil)acridina (L_O), em CDCl_3 usando TMS como referência interna, mostra os sinais característicos de acridina disubstituída, os dois dupletos e o duplo duplete encontrados entre 7,00 e 8,00 ppm e o simpleto em 8,75 ppm atribuídos à parte aromática da molécula e o simpleto em 5,32 ppm atribuído à parte alifática da molécula. Em 4,32 ppm é possível observar um sinal largo com valor de integração inferior ao esperado e atribuído às hidroxilas do ligante. Os demais sinais são atribuídos à acetato de etila, solvente usado na purificação por coluna cromatográfica. Os valores de deslocamento químico para os hidrogênios são compatíveis aos descritos na literatura^{37,38} como o mostrado na Tabela 8

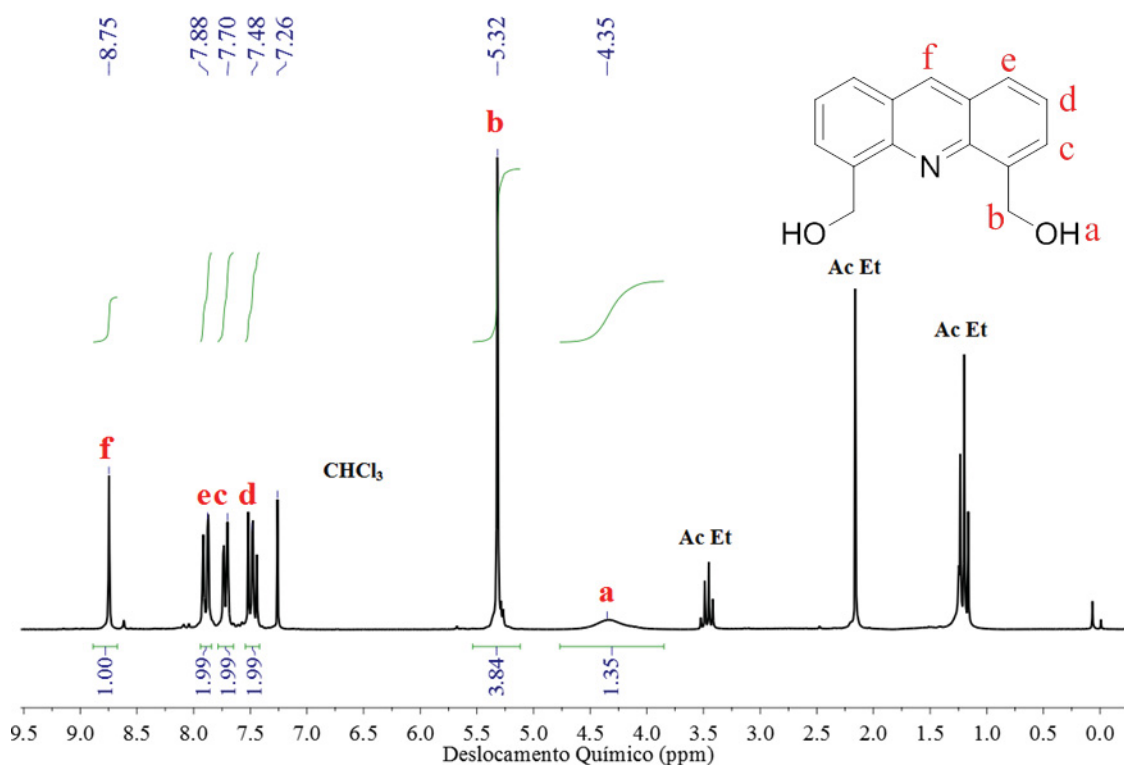
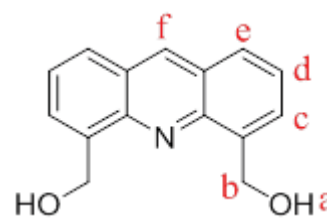


Figura 25: Espectro de ^1H -RMN do ligante L_O em CDCl_3 .

Tabela 8: Deslocamentos químicos e valores de integração referentes ao espectro de ^1H -RMN de L_O .

H	δ (ppm)		Multiplicidade	Integral
	Exp.	Lit. ^{37,38}		
<i>a</i>	4,35	4,10	Sinal largo	1,35
<i>b</i>	5,32	5,33	Simpleto	3,84
<i>c</i>	7,70	7,73	Tripleto	1,99
<i>d</i>	7,48	7,50	Dupleto	1,99
<i>e</i>	7,88	7,92	Dupleto	1,99
<i>f</i>	8,75	8,78	Simpleto	1,00



Nas Figuras 26 e 27, encontram-se os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN e DEPT-135 referentes ao Ligante L_O . Os deslocamentos químicos referentes aos átomos de carbono encontram-se na Tabela 9. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta o número de sinais esperados para molécula, com destaque para o sinal em 64,04 ppm, que foi atribuído ao carbono vizinho ao grupo álcool. O valor de seu deslocamento químico em direção a campos mais baixos é consequência da grande eletronegatividade do átomo de oxigênio, e, portanto, o seu deslocamento químico encontra-se numa região de menor blindagem quando comparado ao carbono equivalente na molécula análoga (41,01 ppm, Tabela 7), onde $\text{R}=\text{NH}_2$. Este é o único sinal em fase negativa no experimento de DEPT-135. O espectro de HSQC, mostrado na Figura 28 foi útil para determinar a atribuição dos sinais na região de aromáticos corroborando com a atribuição dos sinais atribuídos ao fluoróforo, pela correlação entre os núcleos de ^{13}C e ^1H que se acoplam.

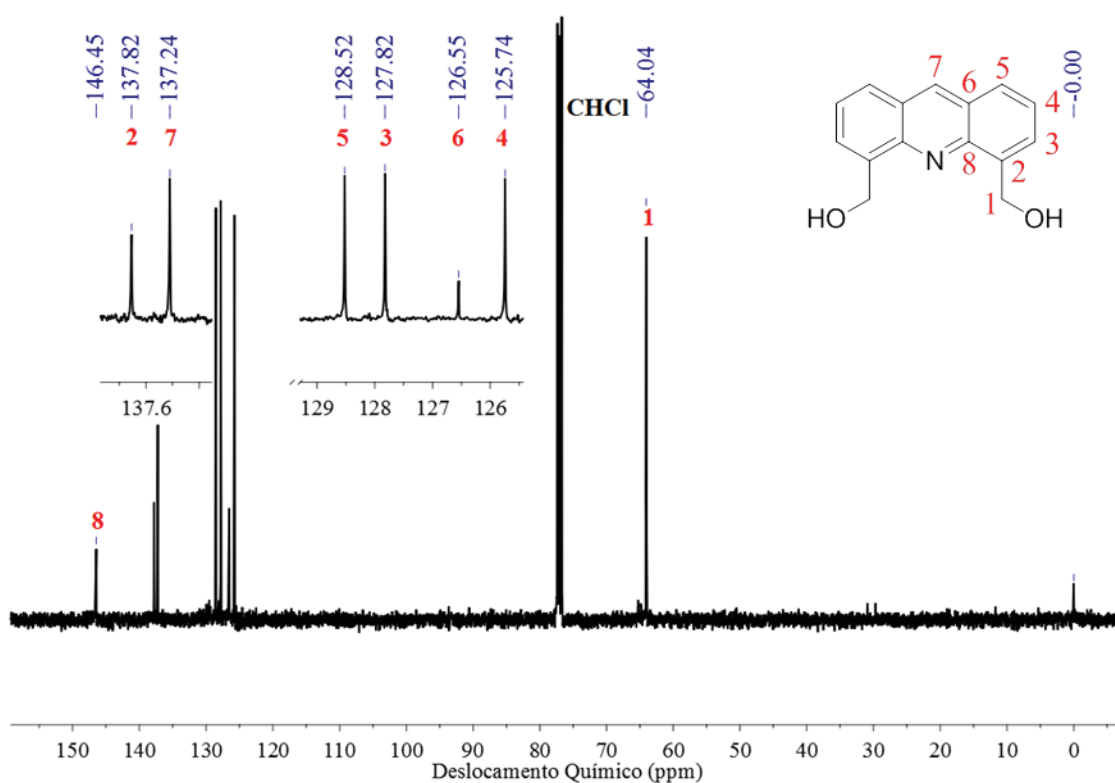


Figura 26: Espectro de ^{13}C -RMN do ligante L_0 em CDCl_3 .

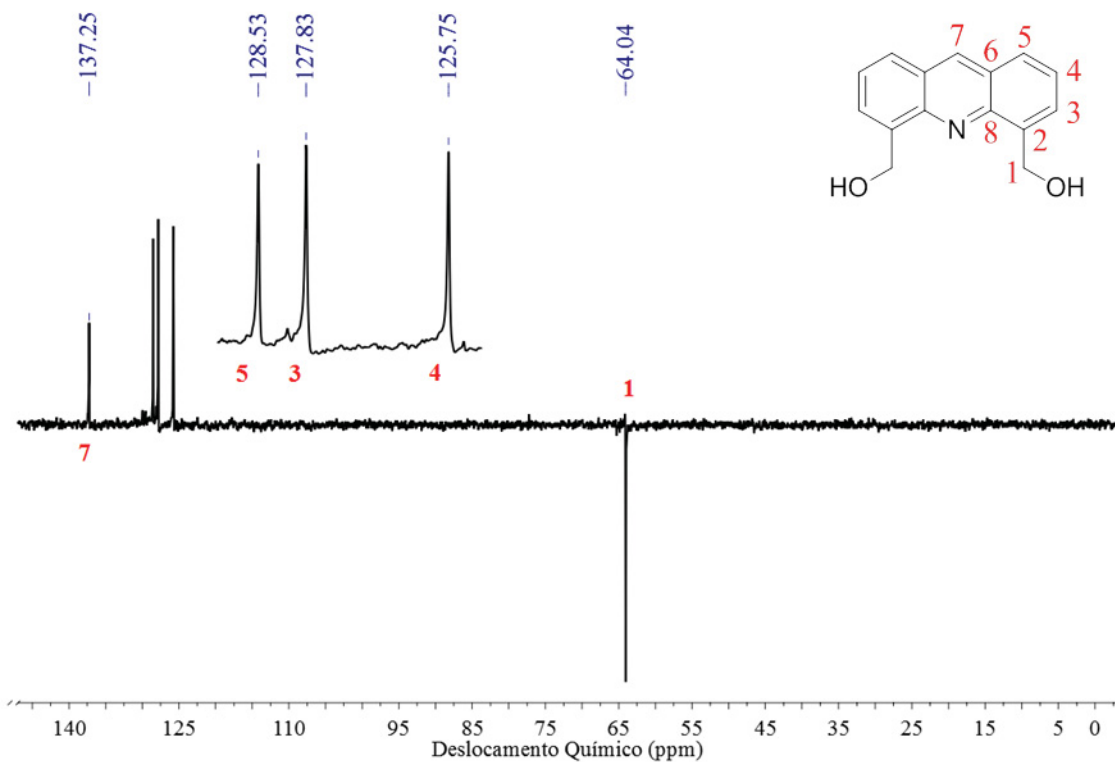
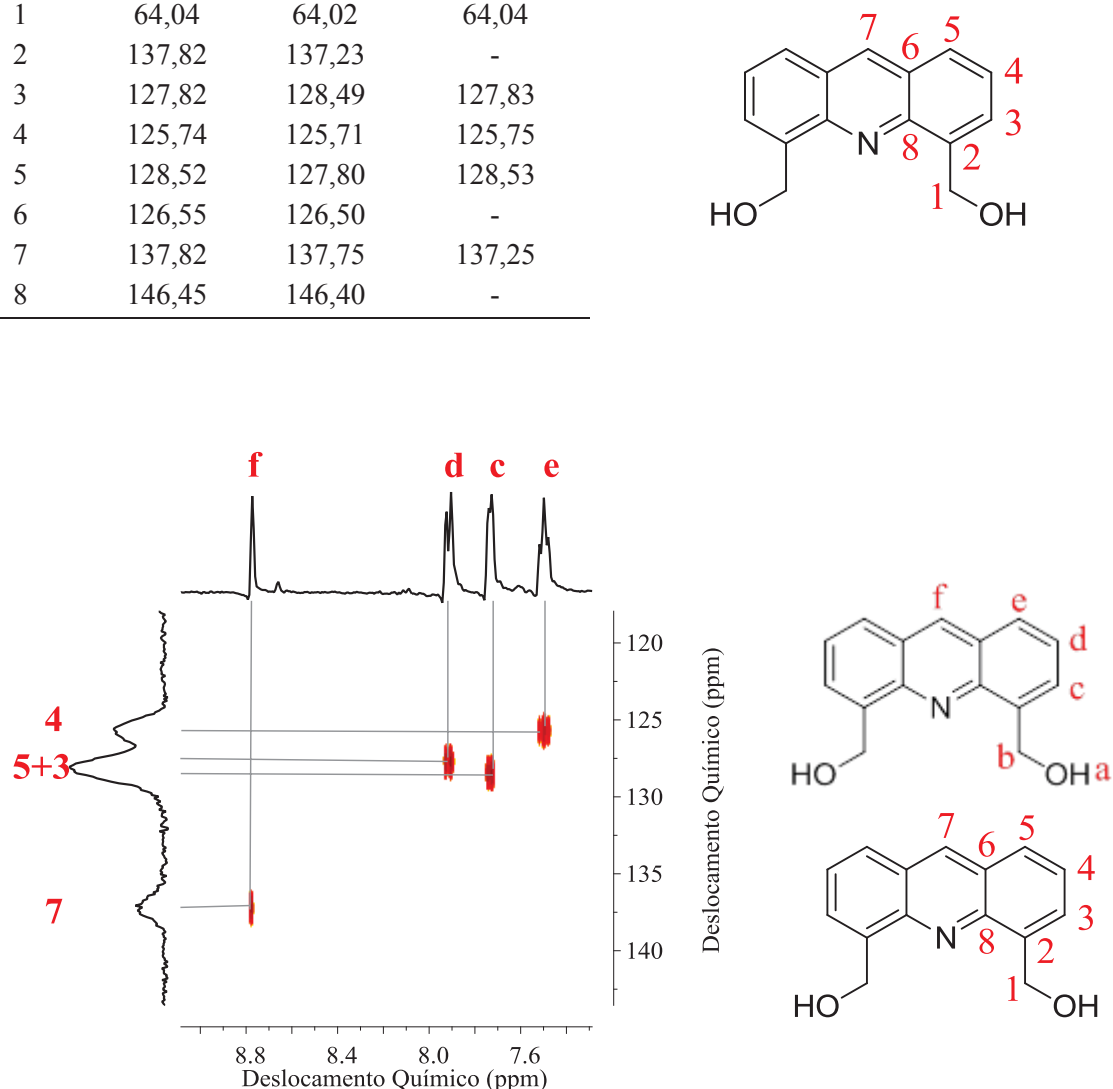


Figura 27: Espectro de DEPT-135 do ligante L_0 em CDCl_3 .

Tabela 9: Deslocamentos químicos referentes aos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT-135 de L_O .

C	δ ^{13}C -RMN (ppm)		δ DEPT-135 (ppm)
	Exp.	Lit. ^{37,38}	
1	64,04	64,02	64,04
2	137,82	137,23	-
3	127,82	128,49	127,83
4	125,74	125,71	125,75
5	128,52	127,80	128,53
6	126,55	126,50	-
7	137,82	137,75	137,25
8	146,45	146,40	-

**Figura 28:** Fragmento do Espectro de ^1H -HSQC do ligante L_O em CDCl_3 .

4.1.4.3. Espectroscopia de RMN do ligante 4,5-Bis(hidrogenotiometil)acridina (L_S)

O espectro de ^1H -RMN em $\text{DMSO}-d_6$, obtido com TMS como referência interna, é apresentado na Figura 29. Os valores de deslocamento químico e de integração se encontram na Tabela 10. Os sinais atribuídos ao fluoróforo são bastante

Resultados e Discussão

semelhantes aos dos ligantes L_N e L_O . O sinal **b** em 5,20 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos, encontram-se numa região de menor frequência em função do maior volume da nuvem eletrônica do grupo tiol, o qual acaba blindando estes núcleos de forma mais efetiva que no caso dos outros dois ligantes ($-NH_2$ e OH).

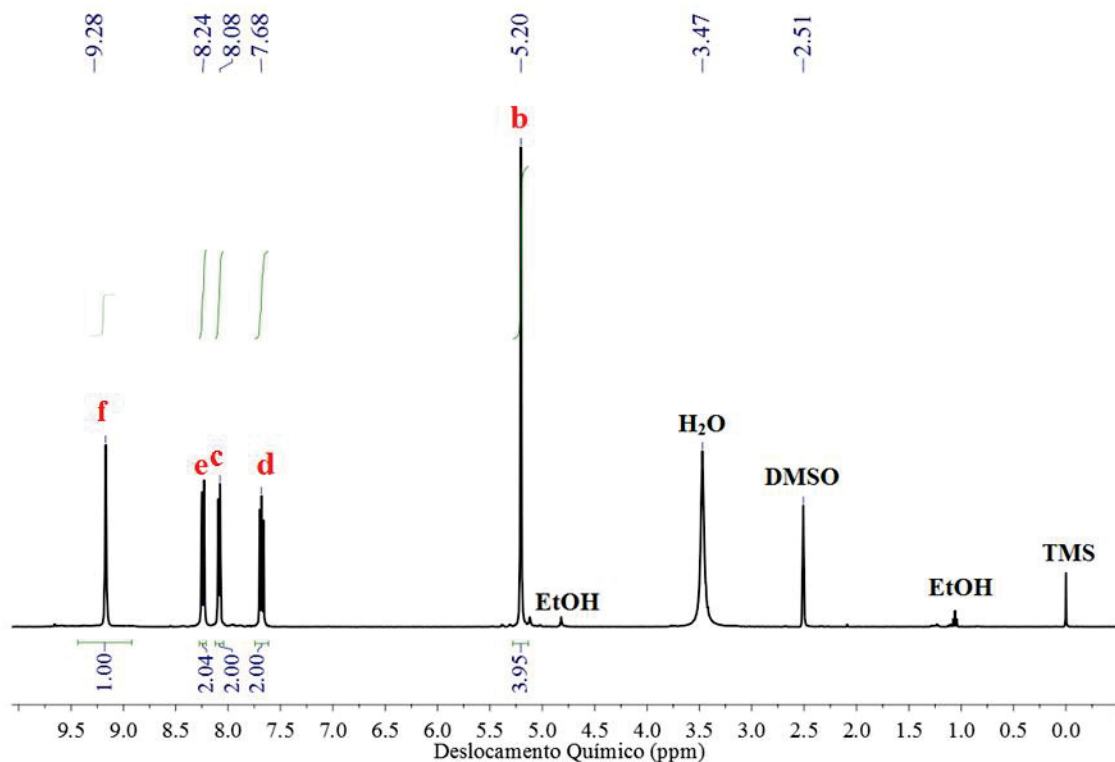
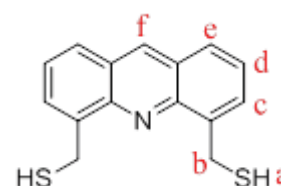


Figura 29: Espectro de 1H -RMN do ligante L_S em $DMSO-d_6$.

Tabela 10: Deslocamentos químicos e valores de integração referentes ao espectro de 1H -RMN de L_S .

H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integral
b	5,20	Simpleto	3,95
c	8,08	Dupleto	2,00
d	7,68	Duplo Dupleto	2,00
e	8,24	Dupleto	2,04
f	9,28	Simpleto	1,00



Nas Figuras 30 e 31 encontram-se os espectros de ^{13}C -RMN e DEPT-135 do ligante L_S e os valores de deslocamentos químicos são resumidos na Tabela 11. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta o número de sinais esperados para esta molécula; os sinais atribuídos aos átomos de carbono da acridina encontram-se em regiões próximas às observadas para os ligantes L_O e L_N . É interessante notar que o sinal presente em

31,77 ppm atribuído aos carbonos metilênicos encontra-se na região de deslocamento químico característica de tióis que é entre 23 e 40 ppm⁴⁹ e próximo ao da mercaptana benzílica, cujo carbono análogo apresenta um sinal em 27,8 ppm⁵⁰, além disso este é o único sinal com inversão de fase no experimento de DEPT-135. Neste experimento também é possível observar o desaparecimento dos sinais atribuídos aos carbonos 2, 6 e 8, pois os mesmos não apresentam nenhum átomo de hidrogênio ligado a eles.

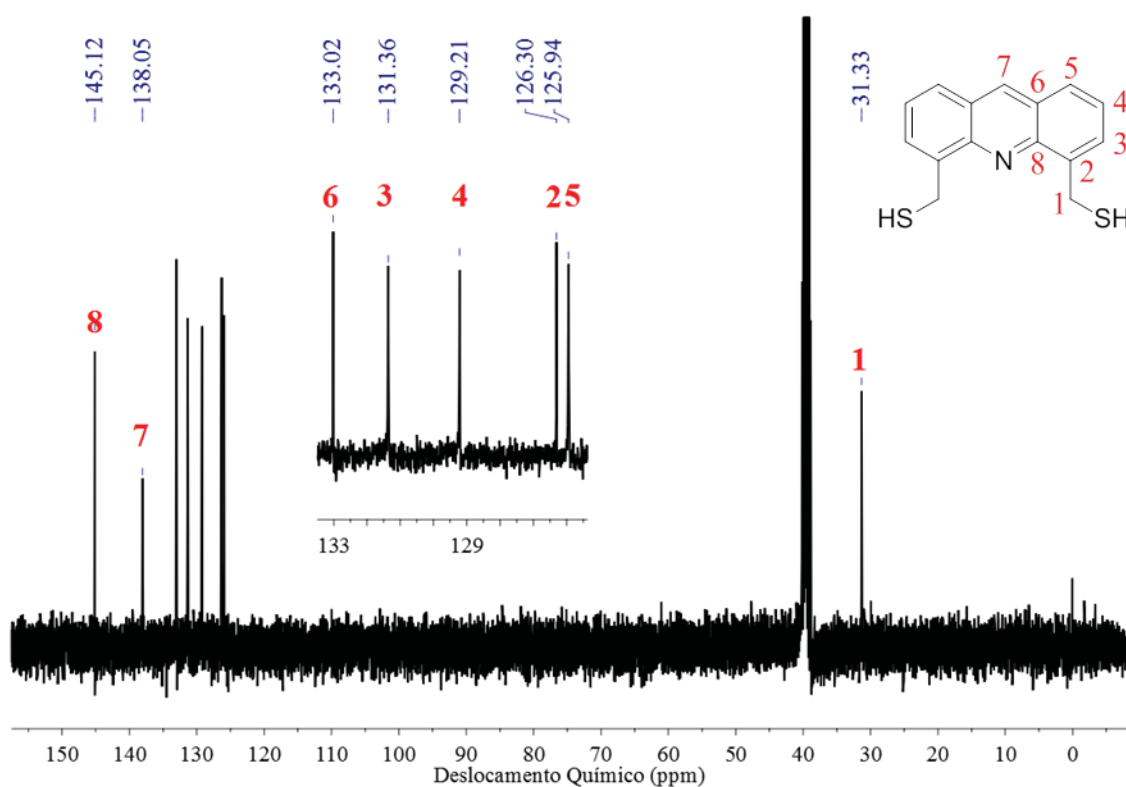


Figura 30: Espectro de ^{13}C -RMN do ligante L_5 em $\text{DMSO}-d_6$.

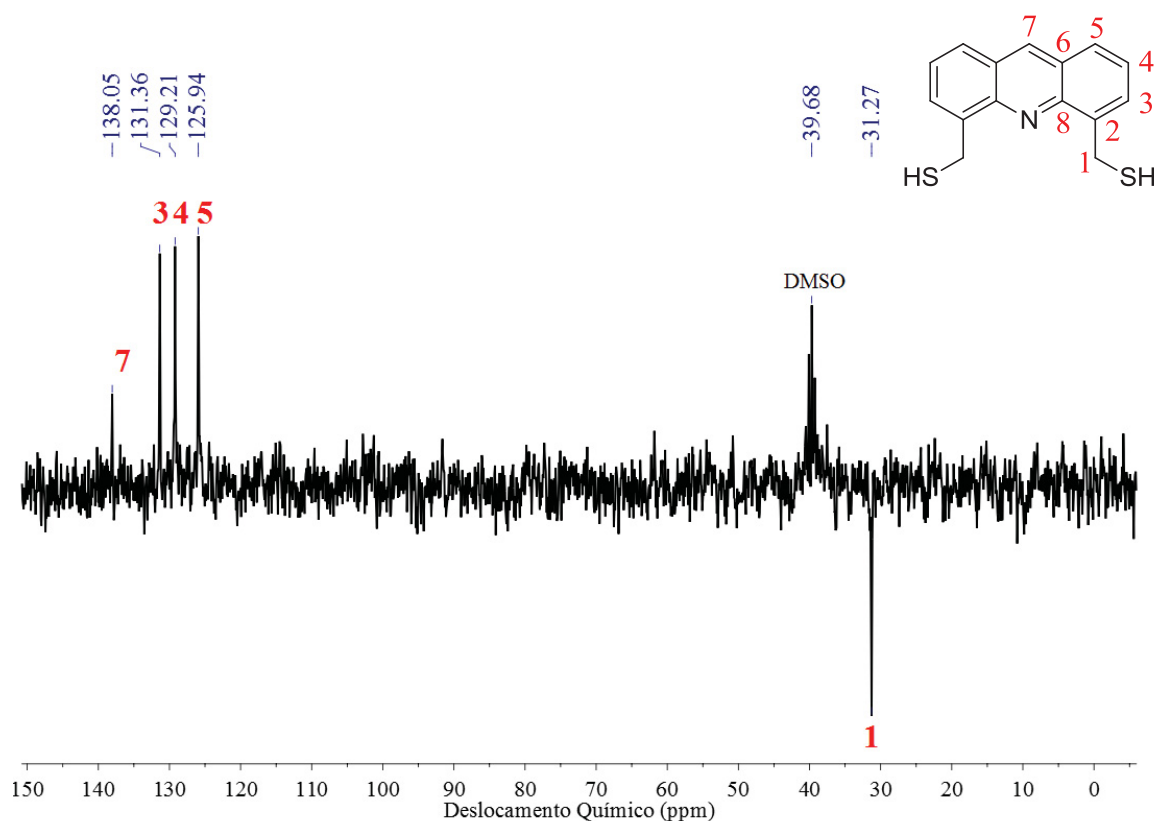
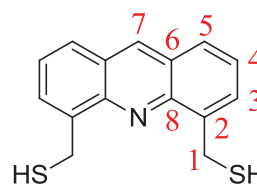


Figura 31: Espectro de DEPT-135 do ligante L_S em $DMSO-d_6$.

Tabela 11: Deslocamentos químicos referente aos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT-135 de L_S .

C	$\delta^{13}C$ -RMN (ppm)	δ DEPT-135 (ppm)
1	31,33	31,27
2	126,30	-
3	131,36	131,36
4	129,21	129,21
5	125,94	125,94
6	133,02	-
7	138,05	138,05
8	145,12	-



As análises espectroscópicas de FTIR e de 1H -, ^{13}C -RMN juntamente com os resultados de análise elementar e espectrometria de massas nos permite concluir que os ligantes/sensores L_N , L_O e L_S foram sintetizados com sucesso e apresentam pureza necessária para que a caracterização fotofísica e os ensaios de afinidade/seletividade por diferentes íons metálicos sejam realizados.

4.1.5. Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Na Figura 32 estão ilustrado o espectros UV-Vis do ligante L_N em metanol. O espectro mostra uma banda em 250 nm, um ombro próximo a 270 nm e outra banda em 355 nm, características de compostos que contêm acridina em sua estrutura⁵¹. A banda observada em 355 nm apresenta uma estrutura fina devido a ocupação dos vários níveis vibracionais dentro do estado eletrônico excitado da molécula em solução⁵¹. Os espectros das demais moléculas sintetizadas se mostraram bastante similares, seus valores de absortividade molares (ϵ) e as atribuições das transições eletrônicas encontram-se na Tabela 12

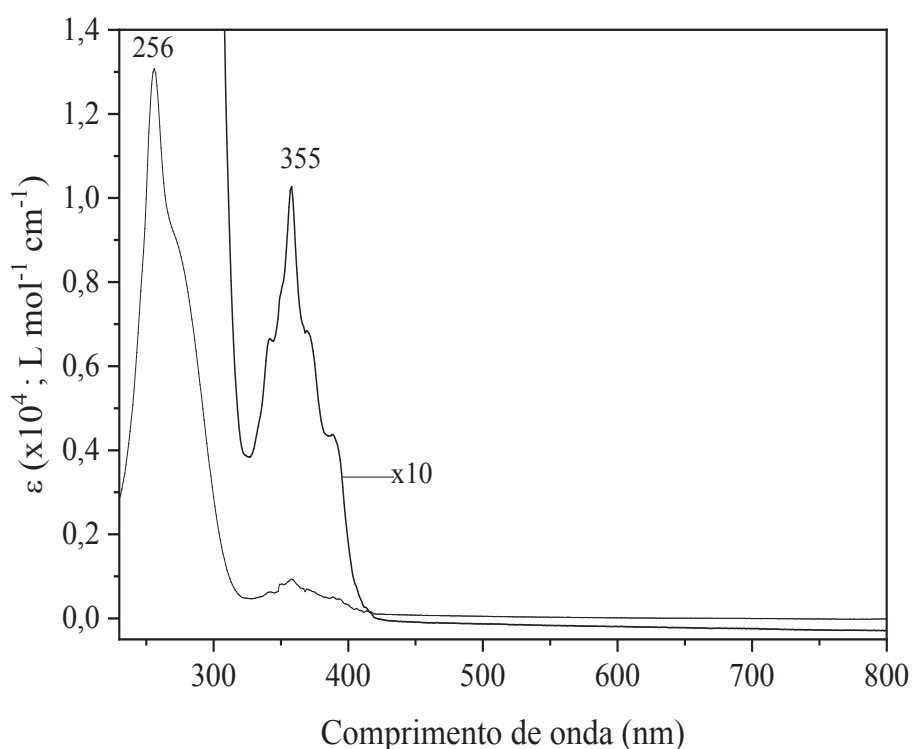


Figura 32: Espectro eletrônico do ligante L_O em metanol.

Tabela 12: Atribuição tentativa e valores de absortividade molar das bandas do espectro UV-Vis dos ligantes L_O, L_N e L_S.

Composto	Banda	Absortividade molar (ϵ) (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Atribuição
L _N	251 nm	1,21x10 ⁵	$\pi \rightarrow \pi^*$
	355 nm	8,65x10 ³	$n \rightarrow \pi^*$
L _O	256 nm	9,94x10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	355 nm	9,68x10 ³	$n \rightarrow \pi^*$
L _S	256 nm	1,14x10 ⁵	$\pi \rightarrow \pi^*$
	352 nm	1,22x10 ⁴	$n \rightarrow \pi^*$

4.1.6. Espectroscopia de emissão fluorescente

Os Espectros de Emissão Fluorescente na sua forma tridimensional e de contorno, e o comparativo entre os espectros de Absorção, Emissão e Excitação são apresentados nas Figuras de 33 a 38 correspondentes aos três ligantes.

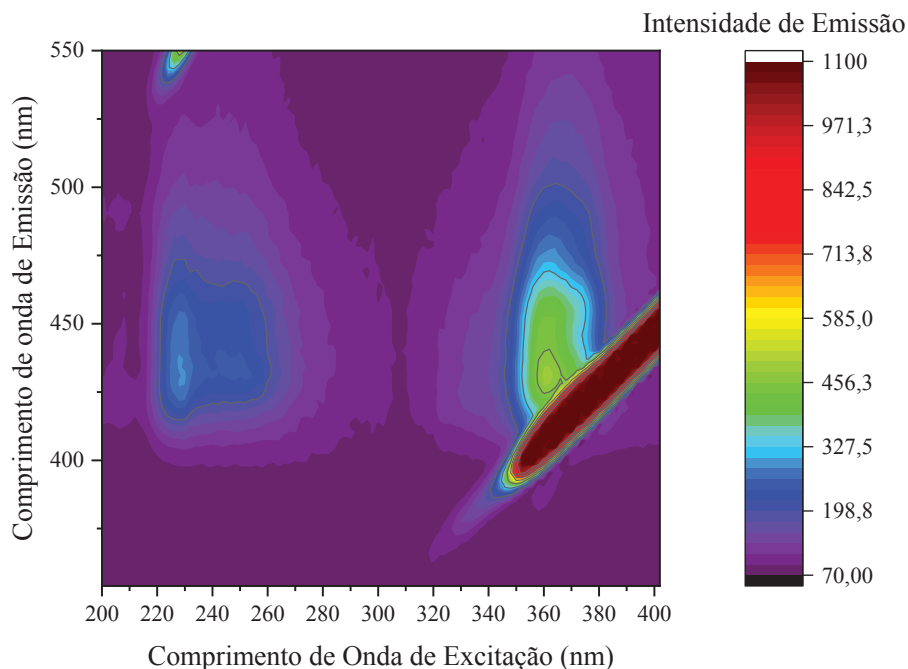


Figura 33: Espectros de contorno da emissão do sensor L_O. Obtidos com *slit's* de excitação e emissão de 10 mm.

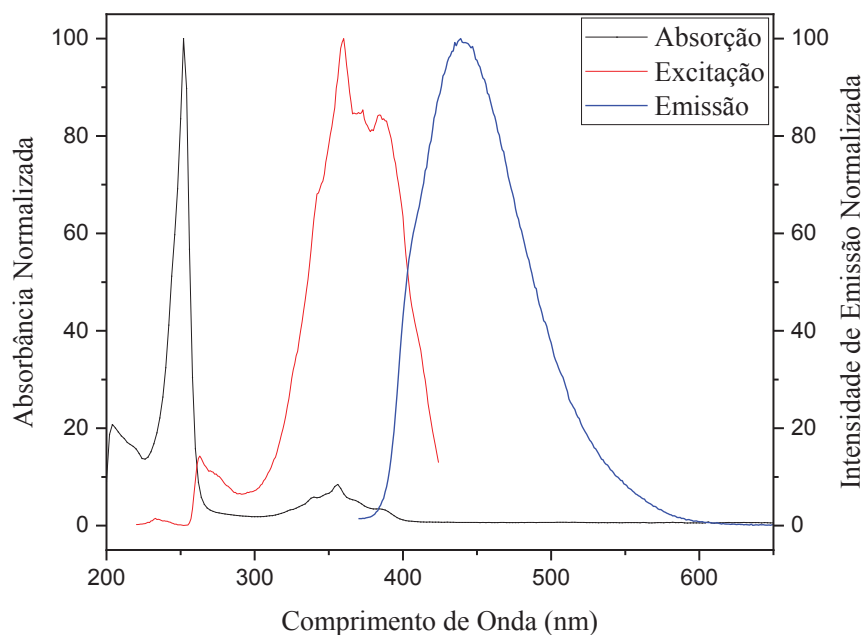


Figura 34: Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{Ex}} = 360 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{Em}} = 439 \text{ nm}$) do sensor L_O . Obtido com *slit's* de excitação e emissão de 10 mm.

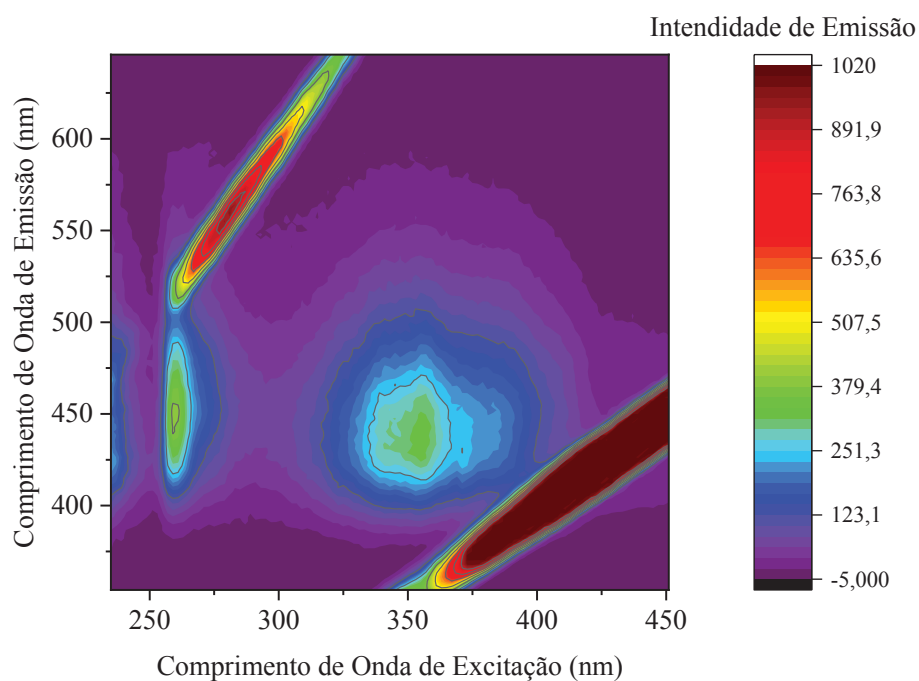


Figura 35: Espectros de contorno da emissão do sensor L_N . Obtido com *slit's* de excitação de 5 mm e emissão de 10 mm.

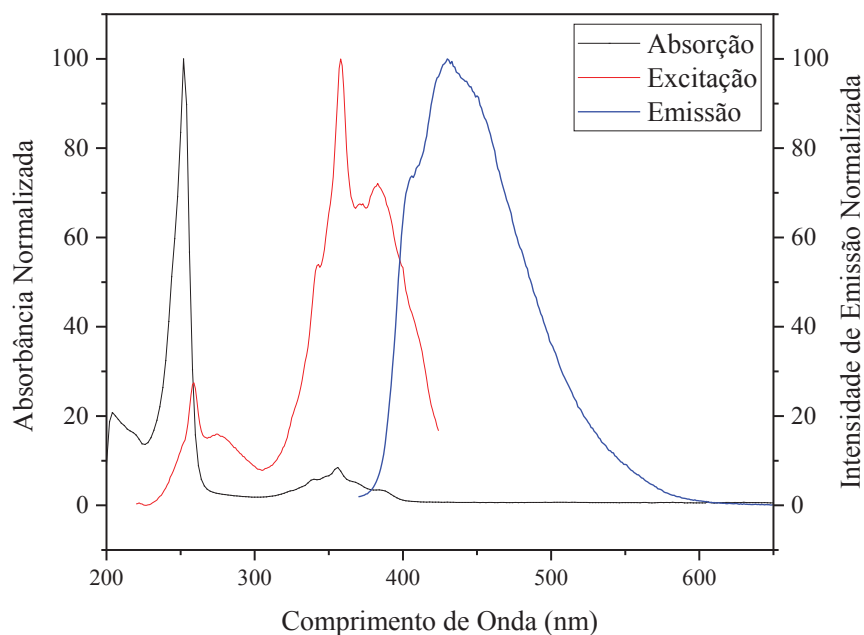


Figura 36: Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{Em} = 358$ nm) e excitação ($\lambda_{Em} = 430$ nm) do sensor L_N . Obtido com *slit's* de excitação de 5 mm e emissão de 10 mm.

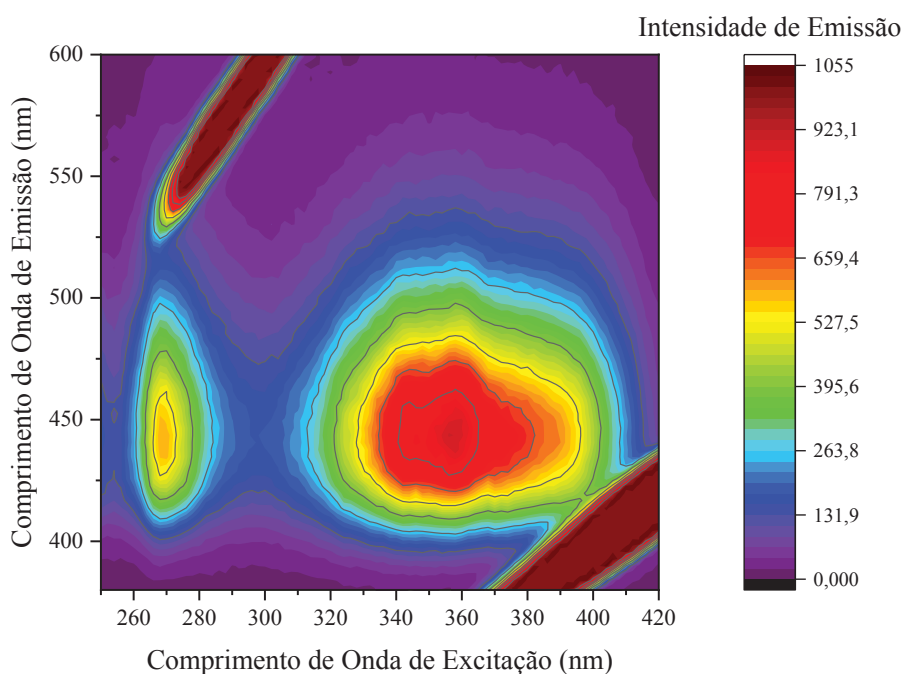


Figura 37: Espectros de contorno da emissão do sensor L_S . Obtidos com *slit's* de excitação de 5 mm e emissão de 20 mm.

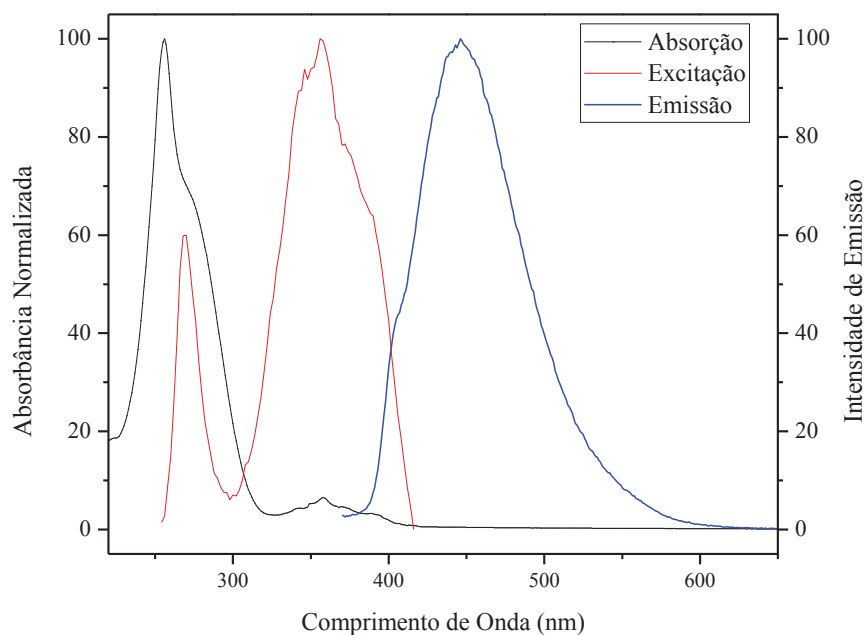
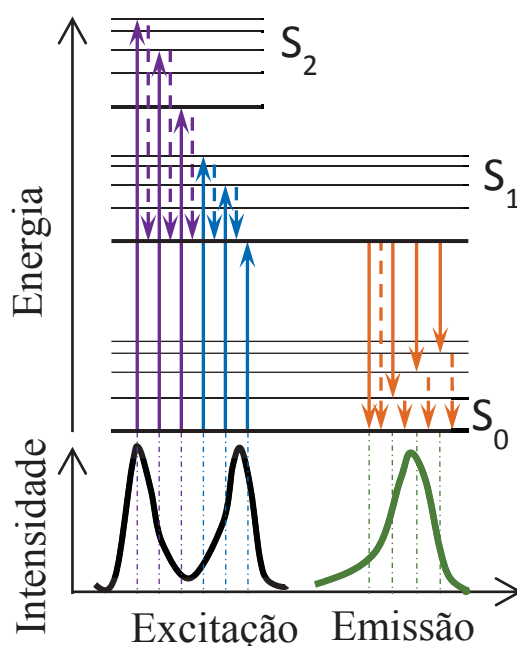


Figura 38: Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{Em} = 358$ nm) e excitação ($\lambda_{Em} = 430$ nm) do sensor L_8 . Obtido com *slit's* de excitação de 5 mm e emissão de 20 mm.

É possível observar nos espectros de emissão um comportamento muito semelhante aos três compostos em função da grande semelhança estrutural entre eles. Os compostos emitem preferencialmente em comprimentos de onda próximos a 430 nm, no início da região do visível próximo ao violeta.

Os espectros de excitação nos mostram que estes compostos apresentam dois máximos de excitação, sendo o mais intenso entre 355 e 360 nm associado à população do primeiro estado excitado (Transição $S_0 \rightarrow S_1$, Esquema 4). A excitação em 260 nm também causa a emissão próximo a 430 nm. A excitação em 260 nm provavelmente leva à população do segundo estado excitado (Transição $S_0 \rightarrow S_2$, Esquema 4), que por sua vez decai através de processos de conversão interna do ligante e uma parte destas moléculas excitadas ao invés de decair diretamente para o estado fundamental decaem de modo não-radiativo para o primeiro estado excitado (Transição $S_1 \rightarrow S_2$, Esquema 4), em seguida, emitindo através da fluorescência (Transição $S_0 \rightarrow S_1$, Esquema 4), como mostrado no diagrama de Jablonski simplificado do Esquema 4.



Esquema 4: Diagrama de Jablonski simplificado.

Também é possível observar que os máximos de excitação estão próximos aos máximos de absorção na molécula, contudo a banda que menos absorve radiação é a que emite de forma mais efetiva, isto deve-se ao fato de que quando a molécula encontra-se no segundo estado excitado, existem muito mais processos de decaimentos não radiativos competindo com a fluorescência, desta forma apenas uma pequena parte da absorção é convertida em emissão. Isso não ocorre quando a molécula se encontra no primeiro estado excitado, porque a probabilidade é maior para o decaimento ocorrer por emissão de radiação luminosa.

Na Tabela 13 encontra-se um resumo dos máximos das bandas de absorção, excitação e de emissão onde é possível observar que os três sensores absorvem na região do ultravioleta e emitem no início da faixa do visível. Os sensores apresentam um deslocamento Stokes relativamente grande, o que indica que uma grande parte da energia absorvida é perdida por outros mecanismos não-radiativos. Esta perda energética se reflete nos baixos valores de rendimento quântico apresentado pelos três compostos. Os tempos de vida da fluorescência não puderam ser obtidos com exatidão em função dos baixos valores de rendimento quântico (inferiores a 1%).

Tabela 13: Valores dos máximos de excitação e emissão para os sensores L_O, L_N e L_S.

Composto	Acridina*	L _O	L _N	L _S
$\lambda_{\text{excitação}}$	350 nm	360 nm	358 nm	356 nm
ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	1,38x10 ⁴	8,65x10 ³	9,68x10 ³	1,22x10 ⁴
$\lambda_{\text{emissão}}$	415 nm	439 nm	430 nm	446 nm
Deslocamento Stokes	65 nm	79 nm	72 nm	90 nm
Rendimento Quântico	1,0%	0,2%	0,4%	0,4%

*Dados fotofísicos em etanol

4.2. Investigação de seletividade dos sensores frente a cátions inorgânicos

A espectroscopia de emissão fluorescente pode ser usada com a finalidade analítica para identificação de diferentes analitos em solução. Em razão das propriedades luminescentes dos ligantes sintetizados e da capacidade de atuarem como quelantes, os mesmos foram testados como sensores. Além disso, o ligante L_O já havia sido descrito na literatura por Zhou e colaboradores³¹, como sensor seletivo para Pd²⁺ em condições experimentais distintas das empregadas neste trabalho.

4.2.1. Avaliação de sensibilidade dos sensores frente a presença de diferentes cátions em solução

A coordenação de um íon metálico a um sensor luminescente geralmente causa alterações na fluorescência, sendo a intensificação (*chelation-enhanced fluorescence* ou CHEF) e a supressão (*chelation-enhanced quenching* ou CHEQ) as mais comuns. O primeiro caso, o CHEF é mais comum quando há a quelação de íons não redox ativos e de camada cheia “*closed shell*”, como no caso dos complexos de Zn²⁺, Cd²⁺ e Al³⁺; já o CHEQ é resultado da quelação de um íon redox ativo e/ou “*open shell*”, como Cu²⁺, Cr³⁺ e Fe³⁺⁵².

Para avaliar o efeito da presença dos íons foram realizadas medidas dos espectros de emissão dos três ligantes, usando o comprimento de onda de excitação em 355 nm para os três sensores na razão molar 1:1 (cátion/sensor) individualmente para

cada cátion. A avaliação do efeito de sensoriamento foi dada em função da variação dos perfis espectrais e dos máximos de emissão de cada sensor. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para constatar o efeito da presença do ânion foi realizado um teste de referencia utilizando um cátion que não se ligaria covalentemente ao sensor, como um cátion orgânico, desta forma optou-se pelo uso do cloreto de tetrametilamônio, Neste teste, observou-se que não houve nenhuma variação significativa na emissão na presença deste sal, Indicando que as variações de intensidade espectrais observadas são causadas pela interação da molécula sonda com os cátions metálicos e não pela presença do ânion cloreto comum aos demais sais usados.

Para o sensor L_O , como mostrado nas Figuras 39 e 40, observou-se que não houve alteração significativa na intensidade de emissão na presença de diferentes cátions. Zhou e colaboradores³¹ relataram a seletividade do ligante L_O para íons de Pd^{2+} , porém os autores usaram outras condições experimentais e, além disso, diferentes tipos de ânions. Portanto, os resultados observados no presente estudo sugerem que as condições experimentais são relevantes e afetam a seletividade de L_O em meio aquoso.

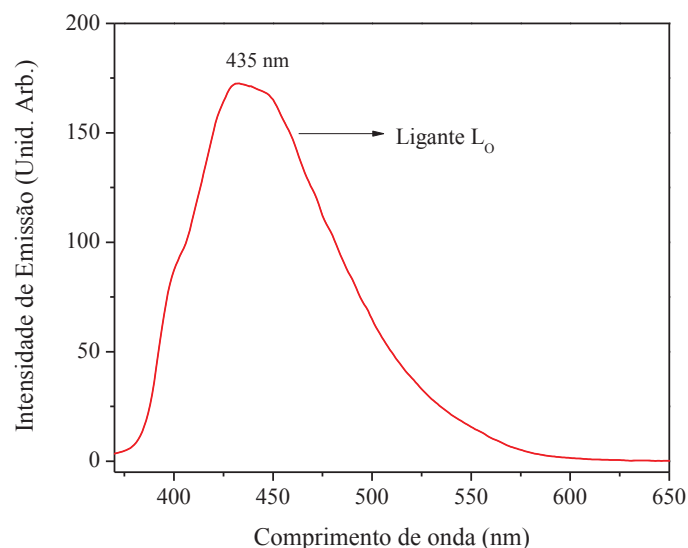


Figura 39: Espectros de emissão do ligante para o sensor L_O ($\lambda_{ex}=355$ nm).

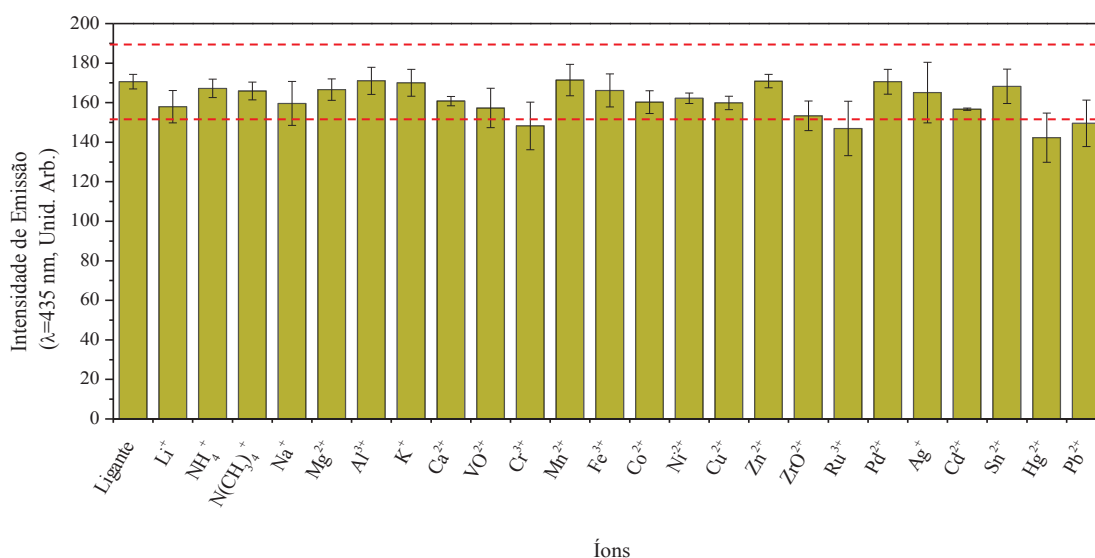


Figura 40: Intensidade de emissão do ligante na presença de diversos cátions para o Ligante L_O ($\lambda_{\text{Ex}} = 355 \text{ nm}$; $c_{L_O} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ e $c_A = 100 \text{ mmol L}^{-1}$).

Para o ligante L_N , observou-se nos espectros de emissão e no gráfico comparativo presentes nas Figuras 41 e 42 que existe um grande aumento de aproximadamente 230% na intensidade de emissão fluorescente na presença do íon Zn^{2+} indicando que este ligante é seletivo à presença deste cátion. As variações quase nulas de emissão para as demais espécies em relação ao Zn^{2+} também indica a alta especificidade do ligante, despertando um grande interesse no potencial analítico do ligante L_N como um possível sensor para este íon.

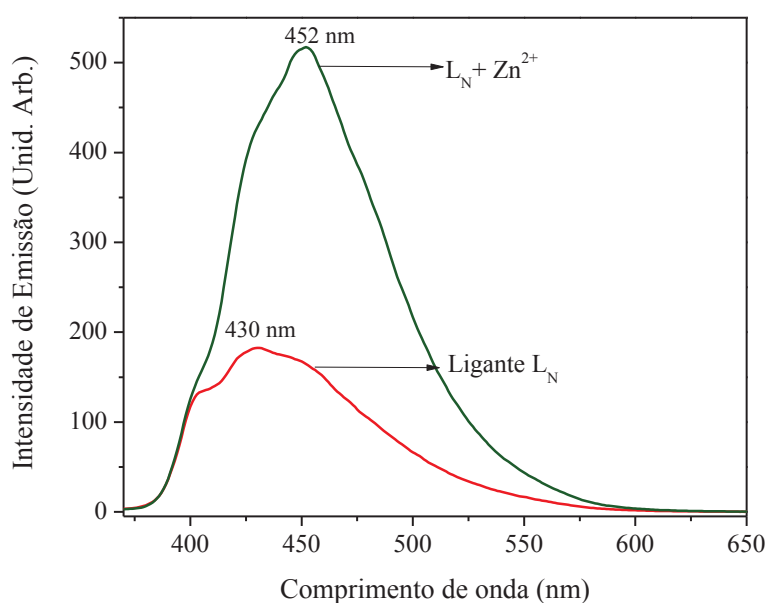


Figura 41: Espectros de emissão do ligante na presença do cátion Zn^{2+} para o ligante L_N ($\lambda_{\text{Ex}} = 355 \text{ nm}$).

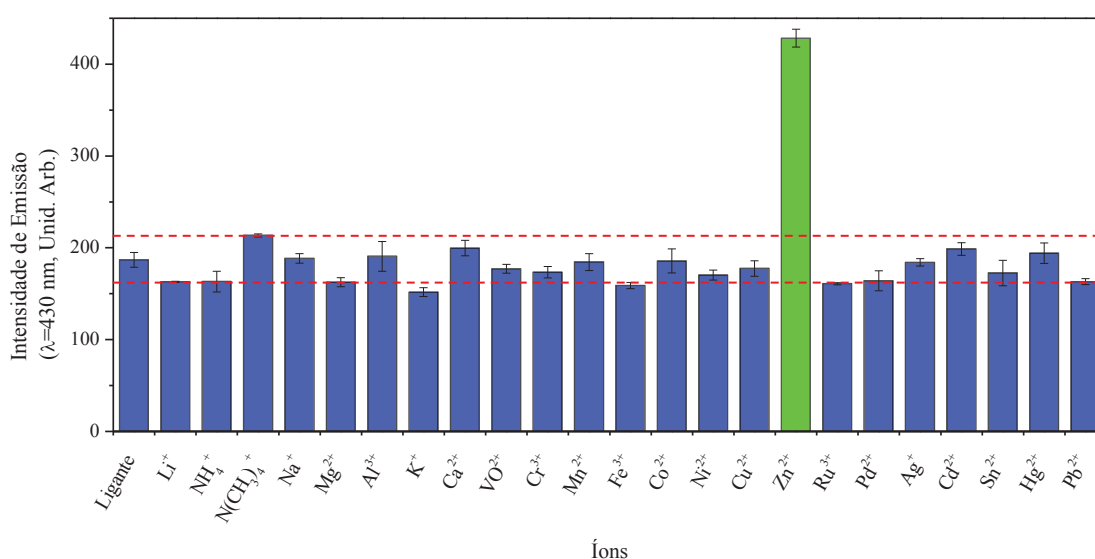


Figura 42: Intensidade de emissão dos ligantes e na presença de diversos cátions para o Ligante L_N ($\lambda_{\text{Ex}} = 355 \text{ nm}$; $c_{\text{LN}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ e $c_{\text{A}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$).

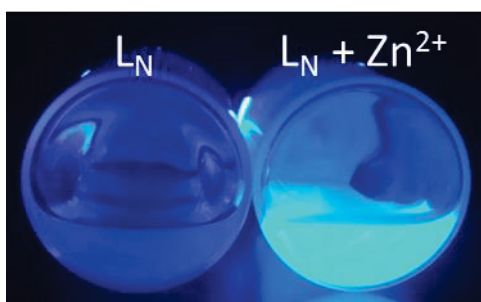
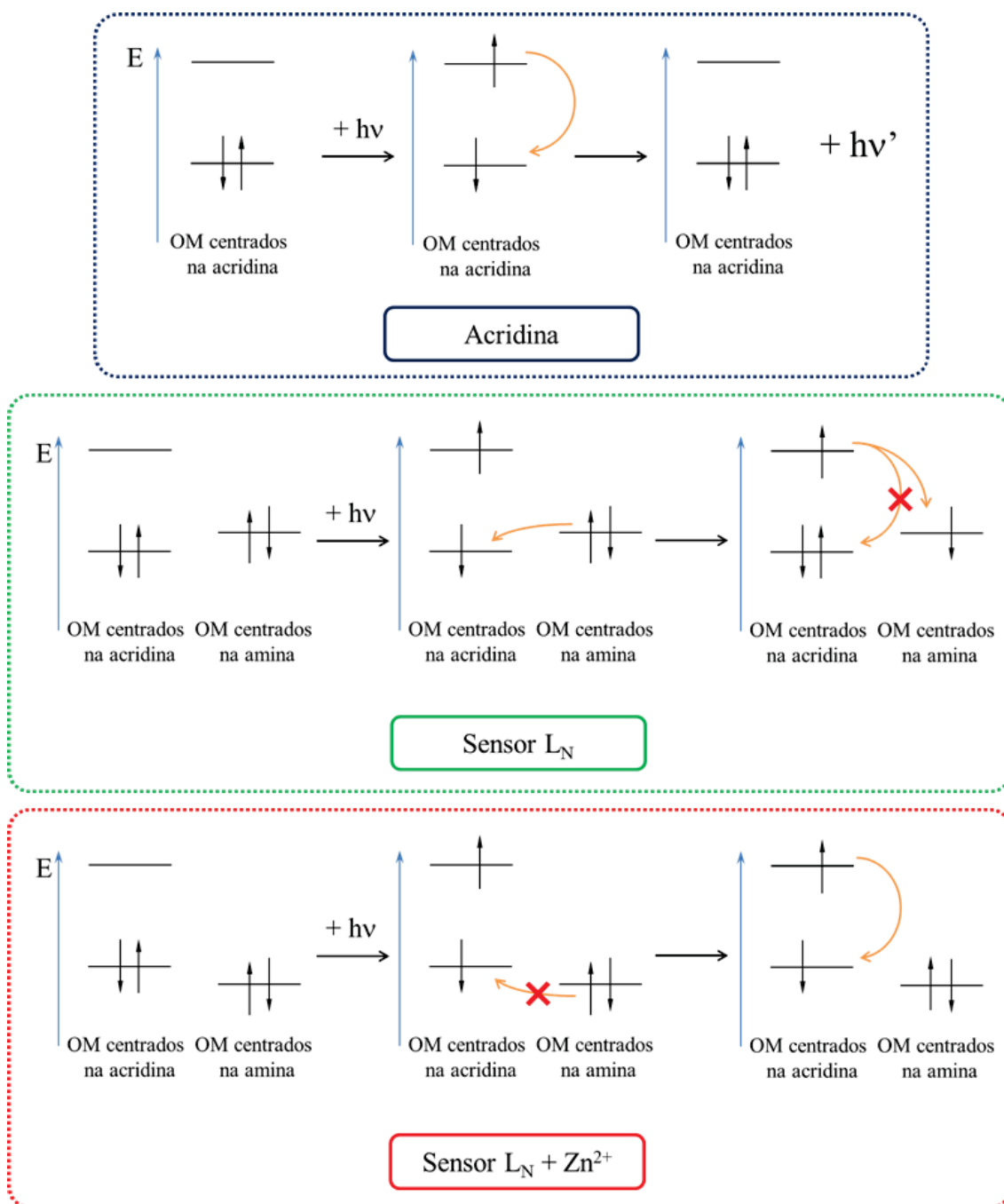


Figura 43: Imagem da Emissão do ligante na presença e na ausência do ion Zn^{2+} .

Também foi possível observar um deslocamento no máximo de emissão de 430 nm para 452 nm, sugerindo que o produto formado possivelmente é um complexo estável de Zn^{2+} . A estabilidade do complexo se manifesta na maior estabilização dos orbitais moleculares centrados no sensor derivado da acridina, e, tem como consequência, o deslocamento batocrômico para 452 nm na emissão radiativa. A maior intensidade de luminescência observada no complexo de Zn^{2+} -L_N, quando comparada ao ligante livre, indica que o decaimento radiativo predomina frente à dissipação de energia por meio de vibrações^{53,54}. Os modos de vibração de alta energia como as deformações axiais N-H são muito eficientes na supressão da luminescência⁵³. Este resultado sugere que o ligante L_N se liga aos íons de Zn^{2+} através dos grupos $-\text{NH}_2$, alterando a distribuição eletrônica no fluoróforo.

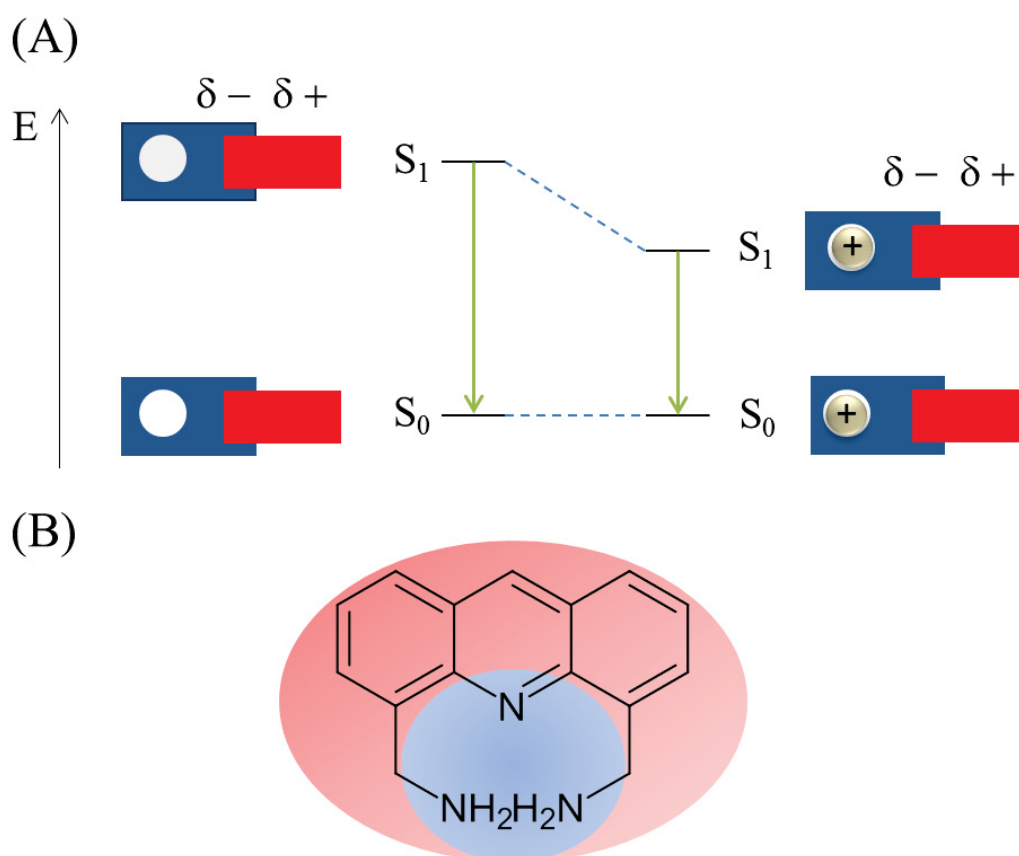
Um fenômeno que pode ajudar a entender estas mudanças na diferença do espectros de emissão na presença do analito é a transferência de carga intramolecular fotoinduzida (PICT = photoinduced charge transfer), que causa a desativação “parcial” da luminescência do fluoróforo, também conhecido como mecanismo de troca ou de Dexter. O processo envolve a comunicação entre dois estados eletrônicos, um localizado no sistema aromático do anel da molécula de acridina, e o outro com maior contribuição do grupo amino. O fenômeno requer a comunicação entre os dois estados eletrônicos no estado excitado. Há, portanto, uma diminuição da intensidade de emissão do fluoróforo L_N , um efeito comum em moléculas orgânicas onde o fluoróforo está ligado a amina através de um espaçador como o metileno^{8,54,5353}. Como mostrado no Esquema 5, o grupo amino doa densidade eletrônica para a porção aromática da molécula no estado excitado, diminuindo a fluorescência da molécula. Quando o grupo amino reage com um cátion (H^+ ou M^{n+}) a transferência de carga é impedida, pois o orbital que antes doava densidade eletrônica para o fluoróforo agora está comprometido doando densidade eletrônica para o centro metálico, desta forma foi observado um aumento abrupto na intensidade fluorescente⁵⁴ como foi constatado neste trabalho.



Esquema 5: (À cima) Ilustração do diagrama de energia dos orbitais de fronteira associados a emissão fluorescente da molécula de acridina (Ao meio) Ilustração da transferência de carga fotoinduzida PICT ou de Dexter, diminuindo a intensidade da fluorescência. (Em baixo) A ligação do grupo $-NH_2$ a um cátion inibi a comunicação entre os estados eletrônicos do fluoróforo, impedindo a transferência de carga e causando o aumento da intensidade de emissão radiativa^{53,54}.

Outro aspecto observado na formação deste complexo é o deslocamento do máximo de emissão, ou seja, a coordenação do cátion metálico afeta a energia dos

orbitais moleculares HOMO centrados no fluoróforo, como mostra o Esquema 5. Uma forma de entender é imaginar o conjunto doador e aceitador de densidade eletrônica como um dipolo cuja magnitude é aumentada no estado excitado na presença de um agente perturbador, no caso representado pelo cátion metálico. Desta forma quando o cátion interage com o grupo receptor, o estado excitado é fortemente estabilizado, pois o momento de dipolo será maior. Consequentemente observa-se um deslocamento batocrômico na banda de emissão (desvio para o vermelho), como mostrado na Figura 44.



Esquema 6: (A) Estabilização de orbitais no estado excitado pelo processo de transferência de carga fotoinduzida. parte **doadora** de densidade eletrônica encontra-se em vermelho, a **aceptora** em azul e o cátion em cinza, adaptado de [43] (B) Associação das regiões doadoras eceptoras de densidade eletrônica na molécula.

O cátion Zn^{2+} presente no ambiente em grande parte vem de sua ocorrência natural, contudo altas concentração em determinados ecossistemas podem ser associados a poluição causada por atividades como a mineração e descargas industriais

^{55,56}, altas concentrações podem levar a efeitos fitotóxicos nestes meios ⁵⁷. Este íon também é fundamental nos sistemas biológicos, pois desempenha funções essenciais no meio celular atuando como um cofator catalítico de proteínas, processos fisiológicos e também no ambiente ^{56,58,59}. No entanto, a anomalias na concentração de Zn^{2+} tem sido associada a doenças neurodegenerativas, câncer de próstata, diminuição da capacidade de cicatrização e redução da produção de insulina ^{60,61}, ressaltando o interesse de sensores para detecção desse importante íon metálico.

Ainda sobre o estudo de afinidades relativas sensor/analito, observou-se (Figura 44 e 45) que o ligante L_S apresenta uma maior variação na intensidade de emissão fluorescente na presença do cátion Hg^{2+} , mostrando uma supressão de aproximadamente 72% na intensidade de emissão, indicando que o ligante é sensível à presença deste íon. Contudo o íon Cd^{2+} aparece como um possível interferente, visto que apresenta uma supressão pequena, mas significativa, mostrando que o ligante L_S se mostrou seletivo, porém não específico para Hg^{2+} . Esta seletividade por metais pesados e de alta polarizabilidade como Hg^{2+} e Cd^{2+} pode ser atribuída à presença do grupo tiol no ligante, que contém o átomo macio de enxofre. Ensaios para a detecção de cádmio e de mercúrio em meio aquoso são, particularmente, de grande importância em função da alta toxicidade destes íons para todas as formas de vida, aparecendo como contaminantes ambientais provenientes da mineração e das indústrias metalúrgicas⁶².

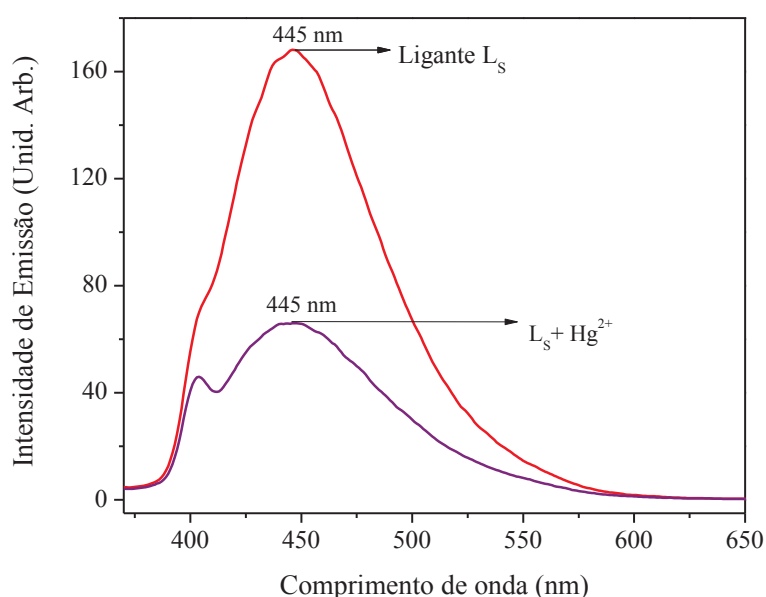


Figura 44: Espectros de emissão do ligante e na presença do cátion Hg^{2+} para o ligante L_S ($\lambda_{\text{Ex}} = 355 \text{ nm}$).

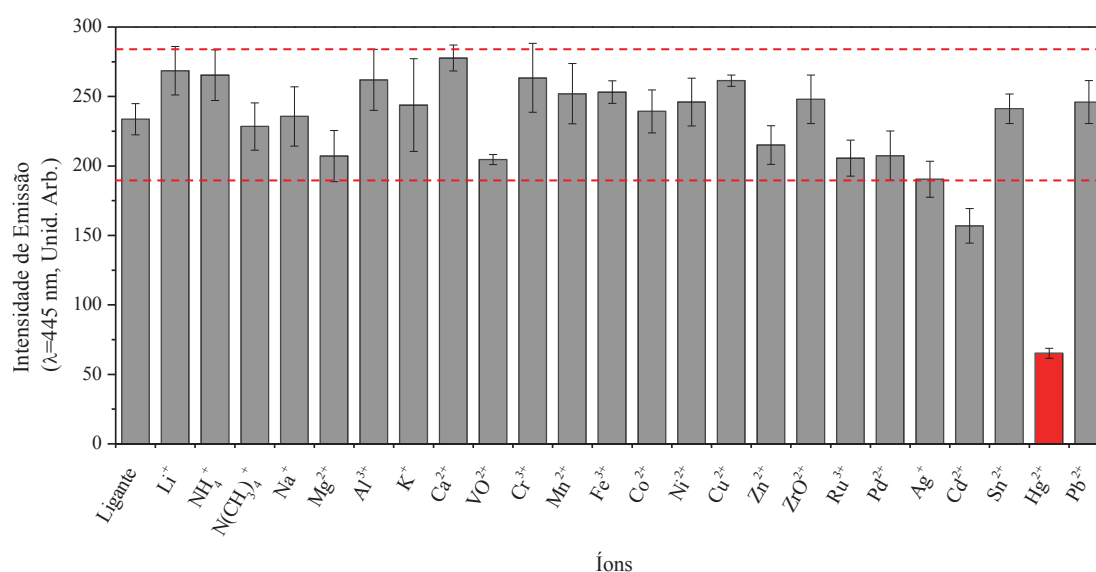


Figura 45: Intensidade de emissão dos ligantes na presença de diversos cátions para o Ligante L_S ($\lambda_{\text{Ex}} = 355 \text{ nm}$; $c_{\text{Ls}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ e $c_{\text{A}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$).

Não há resultados experimentais que permitam sustentar o tipo de mecanismo de supressão, mas possivelmente ocorra de forma semelhante ao descrito no Esquema 5 para o sistema L_N/Zn²⁺.

Os íons de metais pesados são extremamente tóxicos e amplamente usados, sendo assim desastrosos para o meio ambiente e a saúde humana⁶³. O Hg²⁺ é um dos poluentes mais letais e pode se acumular nos corpos humanos através da cadeia alimentar^{64,65} e, devido à sua alta tiofilicidade, causa inúmeros problemas de saúde.

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) meio desta portaria preconiza que os níveis aceitáveis de mercúrio em água devem ser inferiores a 0,001 mg/L para consumo humano⁶⁶. Portanto, o desenvolvimento de um métodos sensíveis, de baixo custo e eficaz para a detecção quantitativa de Hg²⁺ é muito importante, particularmente em amostras de água. De fato, existem várias técnicas instrumentais tradicionais para a detecção de íons de mercúrio, mesmo assim, a maioria dessas técnicas possui limitações, exigindo preparação de amostras complexas e instrumentação dispendiosa, limitando sua aplicabilidade. Por outro lado, sensores moleculares fluorescentes têm atraído uma atenção cada vez maior ultimamente, já que podem detectar analitos de maneira mais conveniente, mostrando excepcional seletividade, alta sensibilidade, menor tempo de resposta, fácil amostragem e menores custo-benefício.

4.2.2. Determinação de estequiometria e da constante de estabilidade dos complexos formados em solução

Com a finalidade de determinar a estequiometria do complexo formado em solução, foi usado o método de Job ou das variações contínuas. Este método consiste em preparar soluções equimolares do sensor e do íon metálico e em seguida misturar volumes distintos das soluções de forma que o volume final e a soma das concentrações do cátion e do sensor se mantenham constantes. Estas soluções foram analisadas por fluorimetria, onde monitorou-se a emissão em 453 nm atribuída à formação do complexo Zn-L_N. O resultado do experimento encontra-se na Figura 46 e indica a formação de um complexo de razão metal:ligante 2:1 (máximo de emissão do complexo próximo de 0,66). Uma proposta para o complexo formado é apresentada na Figura 47, onde a geometria tetraédrica dos centros metálicos é completada por íons clorido, representado por [Zn₂(L_N)Cl₄].

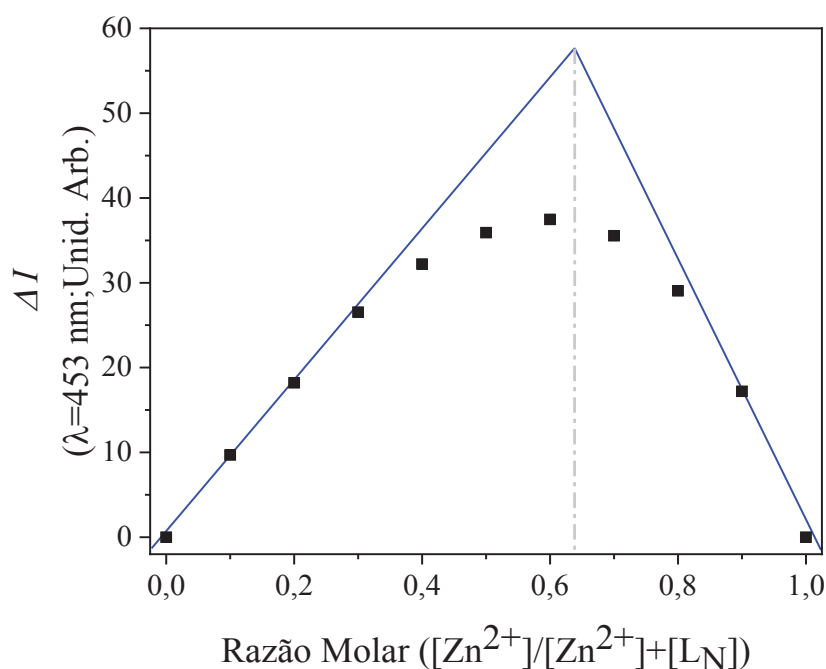


Figura 46: Gráfico de Job para a formação do complexo [Zn₂(L_N)], onde monitorou-se a variação de emissão em diferentes razões molares.

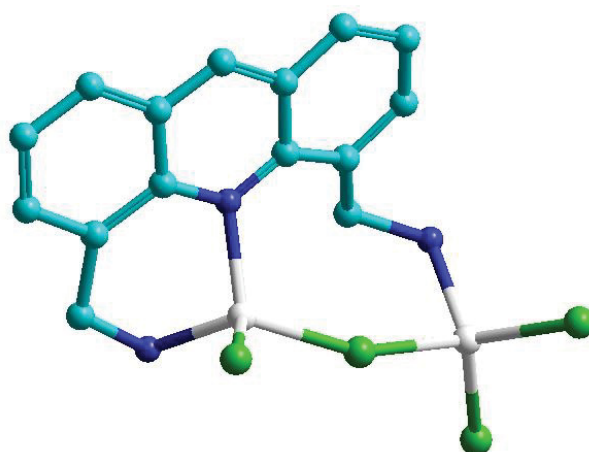


Figura 47: Proposta para o complexo neutro $[Zn_2(L_N) Cl_4]$ onde os átomos de as cores **ciano**, **azul**, **branco** e **verde** representam respectivamente os átomos de **carbono**, **nitrogênio**, **Zinco** e **cloro** respectivamente.

O gráfico de Job para o sistema Hg^{2+}/L_S encontra-se na Figura 48 e indica a formação de um complexo de razão metal:ligante 1:1 (mínimo de emissão do complexo próximo de 0,50). Uma proposta para o complexo formado é apresentada na Figura 49, onde o centro metálico encontra-se em coordenado em geometria linear através dos dois grupos tiolato.

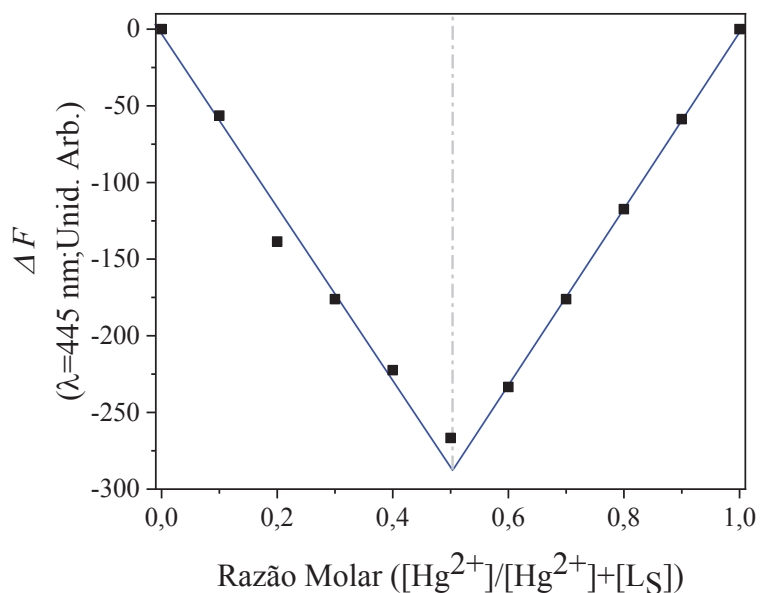


Figura 48: Gráfico de Job para a formação do complexo $[Hg(L_S)]$, onde monitorou-se a variação de emissão em diferentes razões molares.

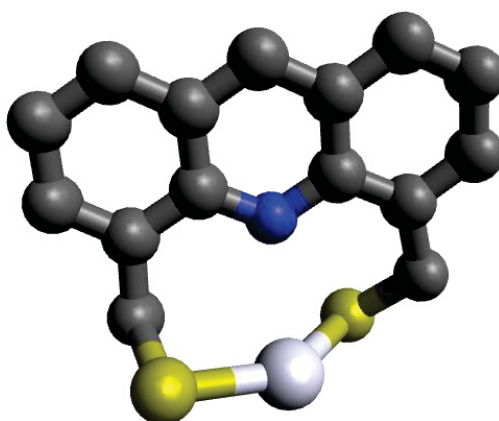


Figura 49: Proposta para o complexo neutro [Hg(L_S)].

Um método bastante usado para determinar a constante de formação do complexo em solução, quando o complexo formado apresenta emissão distinta dos precursores, é método de Benesi-Hildebrand⁶⁷⁻⁶⁹. Ele correlaciona dados da variação de fluorescência em função da variação de concentração do cátion através da equação $\frac{1}{F-F_0} = \frac{1}{(F_\infty-F_0) K [M]^x} + \frac{1}{F_\infty-F_0}$ (2), sendo: F = Intensidade de emissão na presença do analito, F_0 = Intensidade de emissão na ausência do analito e K = Constante de formação do complexo. Desta forma foi possível determinar um valor de $K = 2,43 \times 10^{14} \text{ mol}^{-2} \text{ L}^2$ para a formação do complexo $[\text{Zn}_2(\text{L}_\text{N})\text{Cl}_4]$, e de $K = 5,14 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para a formação do complexo $[\text{Hg}(\text{L}_\text{S})]$, como mostrado nas Figura 50 e 51. O complexo de zinco possui uma constante de formação relativamente alta, indicando a forte tendência de formação do complexo em solução.

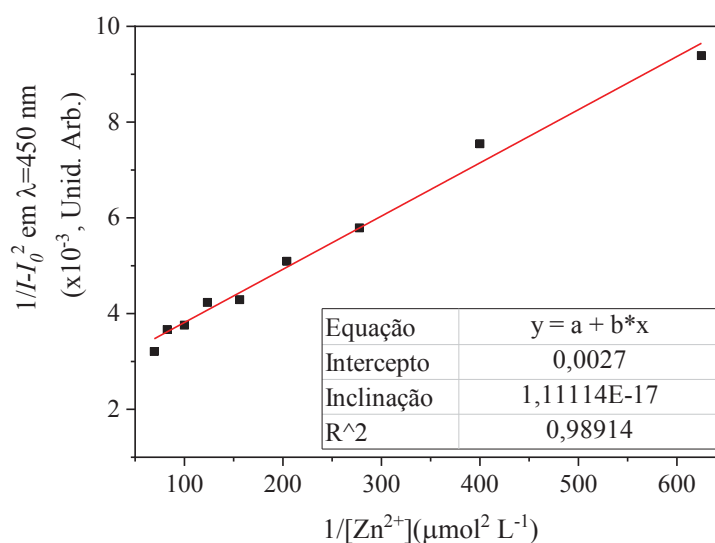


Figura 50: Gráfico de linearização de Benesi-Hildebrand para formação do complexo $[Zn_2(L_N) Cl_4]$.

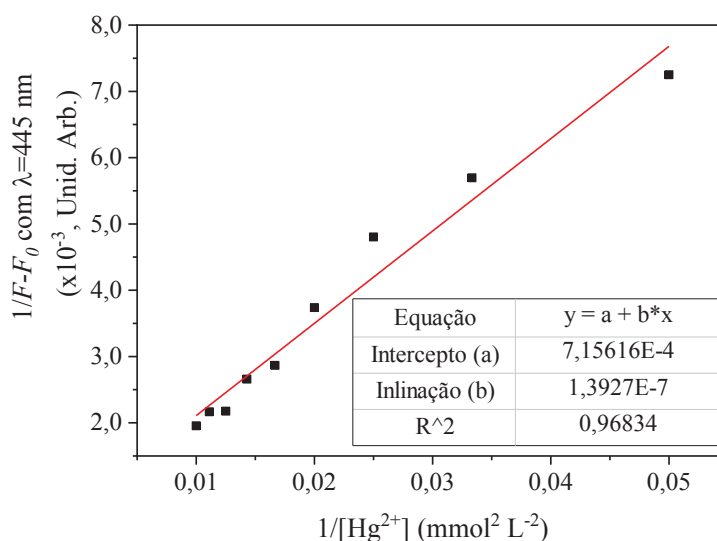


Figura 51: Gráfico de linearização de Benesi-Hildebrand para formação do complexo $[Hg(L_S)]$.

Um método bastante usado para descrever o efeito de supressão molecular é o formalismo de Stern-Volmer que correlaciona a eficiência da supressão (descrita pela razão F_0/F) em função da concentração do agente supressor, $\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[M]_0^x$ (3), sendo: F = Intensidade de emissão na presença do analito, F_0 = Intensidade de emissão na ausência do analito, K_{SV} = Constante termodinâmica de formação do complexo (associada à afinidade metal-ligante), x = Razão m:n determinada pelo método de Job e

$[M]$ = Concentração do agente supressor de fluorescência. O gráfico de linearização de Stern-Volmer encontra-se na Figura 52.

A Constante de Supressão (K_{SV}) encontrada foi de $1,85 \times 10^4$ indicando que a supressão causada pelo cátion de Hg^{2+} é bastante eficiente. Este formalismo aceita que a supressão da emissão possa ocorrer de duas formas, uma estática (através da coordenação do íon) ou dinâmica (através de mecanismos colisionais). Os valores próximos das constantes K e K_{SV} nos permite sugerir uma grande contribuição da supressão estática no decaimento da emissão, corroborando com a proposta de coordenação do analito ao sensor L_S do presente trabalho.

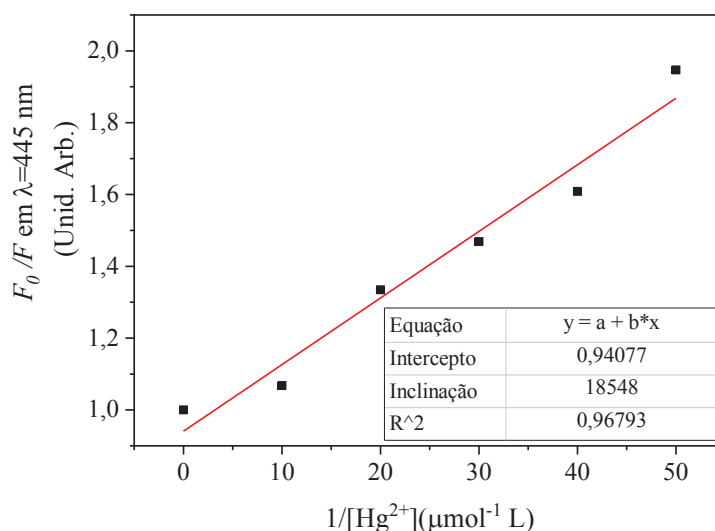


Figura 52: Gráfico de linearização de Stern-Volmer pra o sensor L_S na presença de Hg^{2+} .

4.2.3. Aplicação do sensor L_N na quantificação dos cátions Zn^{2+} .

Com o objetivo de validar o emprego do ligante L_N como sensor para quantificação do íon Zn^{2+} inicialmente realizou-se um estudo da variação da emissão fluorescente com o aumento da concentração do cátion. Os espectros e o gráfico de correlação encontram-se nas Figuras 53 e 54, respectivamente. Observou-se o aumento da intensidade de emissão até cerca de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de íons Zn^{2+} , e a resposta linear se estendeu até cerca de $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

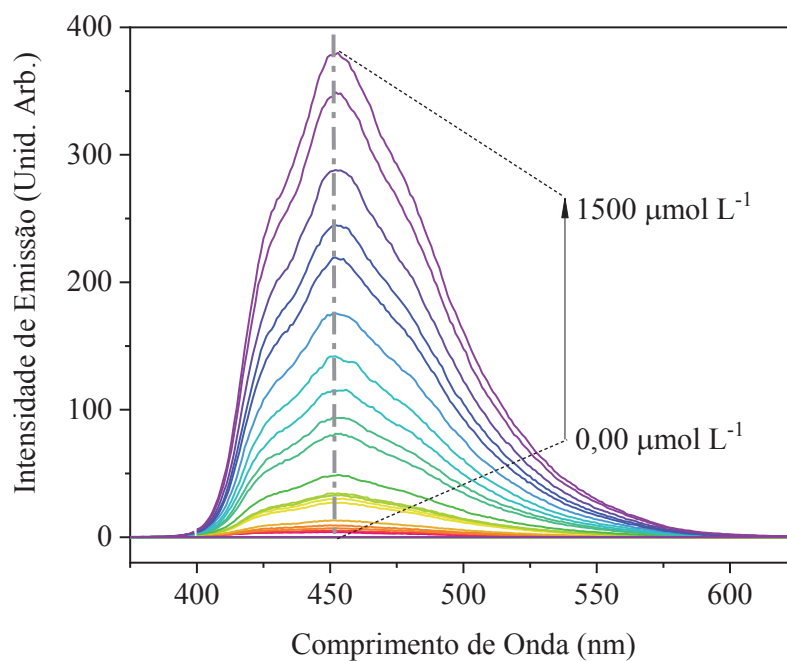


Figura 53: Espectros de emissão em diferentes concentrações de Zn^{2+} , pH=8,20 (Tampão Tris-HCl-KOH).

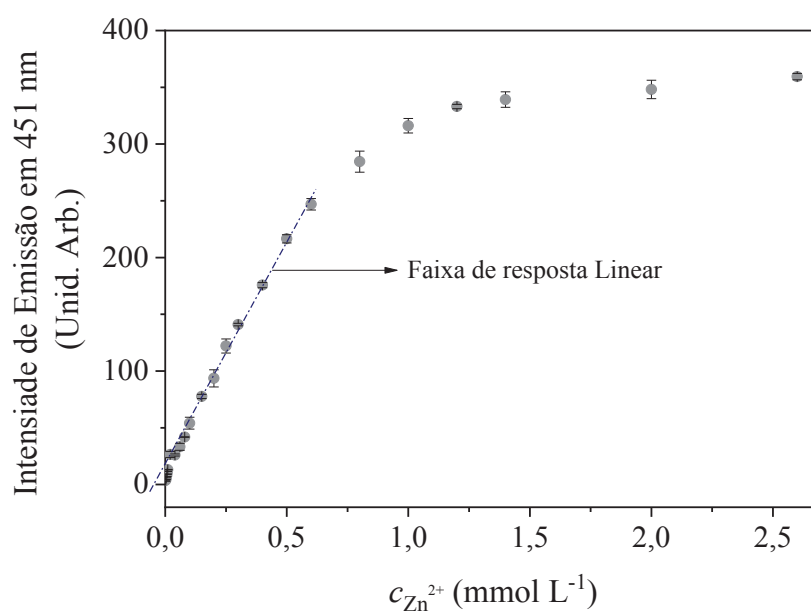


Figura 54: Curva de correlação de emissão do sensor L_N em resposta ao aumento na concentração de Zn^{2+} ($N=3$; Tampão Tris-HCl-KOH).

Os dados foram submetidos à análise estatística com a finalidade de verificar a correlação entre a concentração de íons zinco e a intensidade de emissão, bem como a existência de pontos anômalos dentro de nosso conjunto de dados.

O teste de Grubbs tem como propósito a identificação de dados anômalos ou *outliers*. Estes valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, um erro no cálculo ou até mesmo um erro na preparação da amostra ou aquisição do dado⁷⁰⁻⁷².

No teste de Grubbs, os dados são ordenados em ordem crescente, o maior ou o menor valor são tidos como os valores suspeitos de *outliers*. Sobre estes valores aplica-se o seguinte teste estatístico.

$$G_{\text{calculado}} = \left| \frac{x - \bar{x}}{s} \right| \quad (10)$$

Onde: x = valor suspeito, \bar{x} = média amostral e s é o desvio padrão amostral.

Em função do número de replicatas e do nível de significância α , o valor de $G_{\text{calculado}}$ é comparado com um valor de G_{tabelado} . Se:

$$\begin{cases} G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}: \text{o valor não é considerado um valor extremo} \\ G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}: \text{o valor é considerado um valor extremo e deve ser descartado} \end{cases}$$

Em nosso caso foram testados todos os conjuntos em triplicata (N=3) com nível de confiança de 95% e uma distribuição normal de variabilidade, nos dando um $G_{\text{tabelado}} = 1,154$. Os dados obtidos do teste encontram-se na Tabela 14 onde é possível observar que entre todos os pontos presentes na curva de correlação (Figura 56) não houve nenhum resultado discrepante entre as medidas, em nenhum nível de concentração. Desta forma é possível concluir que não existem valores anômalos no nosso conjunto de medidas de intensidade de emissão.

Tabela 14: Dados do teste de Grubbs para os valores de intensidade de emissão da Figura 56.

Concentração	Amostras			Média	Desvio padrão	Menor valor	G _{calculado}	Status	Maior valor	G _{calculado}	Status
	n=1	n=2	n=3								
0,00E+00	4,119	3,349	3,079	3,516	0,540	3,079	0,809	OK	4,119	1,118	OK
2,00E-06	4,415	3,079	3,954	3,816	0,679	3,079	1,086	OK	4,415	0,883	OK
4,00E-06	5,192	6,500	4,867	5,520	0,864	4,867	0,755	OK	6,500	1,134	OK
6,00E-06	6,931	8,527	8,658	8,039	0,962	6,931	1,152	OK	8,658	0,644	OK
8,00E-06	9,120	10,698	11,213	10,344	1,091	9,120	1,122	OK	11,213	0,797	OK
1,00E-05	13,100	13,246	12,862	13,069	0,194	12,862	1,070	OK	13,246	0,911	OK
2,00E-05	29,564	24,725	25,124	26,471	2,686	24,725	0,650	OK	29,564	1,152	OK
4,00E-05	27,100	25,212	25,817	26,043	0,964	25,212	0,862	OK	27,100	1,096	OK
6,00E-05	34,266	35,591	29,760	33,206	3,057	29,760	1,127	OK	35,591	0,780	OK
8,00E-05	41,879	41,648	42,083	41,870	0,218	41,648	1,020	OK	42,083	0,979	OK
1,00E-04	48,163	58,119	55,922	54,068	5,231	48,163	1,129	OK	58,119	0,774	OK
1,50E-04	79,481	77,515	75,899	77,632	1,794	75,899	0,966	OK	79,481	1,031	OK
2,00E-04	94,030	100,847	85,784	93,554	7,543	85,784	1,030	OK	100,847	0,967	OK
2,50E-04	115,042	126,876	124,370	122,096	6,236	115,042	1,131	OK	126,876	0,767	OK
3,00E-04	141,670	139,669	141,403	140,914	1,086	139,669	1,146	OK	141,670	0,696	OK
4,00E-04	178,049	173,497	175,572	175,706	2,279	173,497	0,969	OK	178,049	1,028	OK
5,00E-04	212,510	219,572	217,540	216,541	3,636	212,510	1,109	OK	219,572	0,834	OK
6,00E-04	244,409	252,680	243,664	246,918	5,004	243,664	0,650	OK	252,680	1,151	OK
8,00E-04	287,337	292,051	274,142	284,510	9,283	274,142	1,117	OK	292,051	0,812	OK
1,00E-03	308,970	321,099	318,313	316,127	6,353	308,970	1,127	OK	321,099	0,783	OK
1,20E-03	331,263	332,838	335,060	333,054	1,908	331,263	0,939	OK	335,060	1,052	OK
1,40E-03	343,307	342,921	331,361	339,196	6,788	331,361	1,154	OK	343,307	0,606	OK
2,00E-03	345,855	357,154	341,451	348,153	8,100	341,451	0,827	OK	357,154	1,111	OK
2,60E-03	362,584	357,154	358,571	359,436	2,817	357,154	0,810	OK	362,584	1,118	OK

4.2.3.1. *Determinação de figuras de mérito para método adotado para a detecção de íons*

A determinação de figuras ou parâmetros de mérito para um método analítico visa atestar, através de evidências objetivas, sua adequação à finalidade pretendida⁷³. Levando em consideração a especificidade no reconhecimento do ligante L_N pelo íon Zn^{2+} em meio aquoso, foi realizada a validação do método proposto de reconhecimento considerando os parâmetros de seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa de resposta linear, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e ensaio de robustez como recomendado pela ANVISA e o INMETRO para ensaios quantitativos. Dados relativos à veracidade na concentração do analito não serão discutidos, pois não se testou nenhum material de referência certificada.

Uma curva analítica nos fornece diversos parâmetros de desempenho, como linearidade, faixa de aplicação, e os limites de detecção e quantificação. Estes parâmetros descrevem a correlação entre o sinal medido e a concentração da espécie a ser quantificada.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer *resultados diretamente proporcionais* entre o sinal analítico e a concentração do analito, dentro de uma determinada faixa, a faixa linear de trabalho^{74,75}.

O limite de detecção representa a *menor concentração do analito ou espécie de interesse que pode ser detectada*, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental^{74,75}.

O limite de quantificação representa a *menor concentração analito ou espécie de interesse em exame que pode ser quantificada com confiabilidade estatística*, utilizando um determinado procedimento experimental^{74,75}.

Na Figura 55 é apresentada uma curva analítica obtida a partir da Figura 54, empregando o sensor L_N para quantificação de Zn^{2+} .

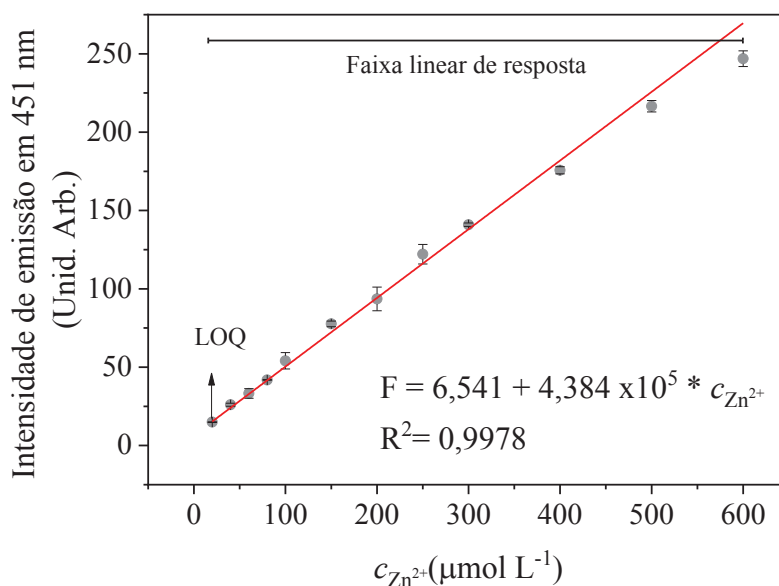


Figura 55: Curva analítica para quantificação de Zn^{2+} na presença do sensor L_N .

A linearidade da curva foi determinada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). A curva analítica é representada pela equação: $F = 76,541 + 4,384 \times 10^5 * c_{\text{Zn}^{2+}}$ com $R^2 = 0,9978$, que é um valor superior ao recomendado pela ANVISA e IMETRO^{46,74} e indica uma boa relação linear entre a concentração do analito e a emissão fluorescente do sensor.

Além do coeficiente de determinação (R^2) no modelo de regressão linear, foi realizada uma análise dos resíduos da curva analítica presente na Figura 55, a fim de verificar se o modelo de equação do 1º grau é realmente o mais adequado para a metodologia proposta. Resíduo é a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores ideais calculados pelo modelo de regressão usado para cada concentração testada. Esta análise foi feita através de três testes: “F” de Fisher (determina se existe diferença significativa entre variâncias^{70,71}), de Cochran (indica a homogeneidade da variância dos resíduos⁷⁰) e de Durbin-Watson (verifica a auto-correlação dos resíduos^{70,71}).

O teste F é usado para verificar se há diferença significativa entre as variâncias de dois grupos de dados (conjuntos amostrais a e b na equação 11), e neste trabalho foram agrupados conforme as replicatas^{14,70,72}. O teste é calculado através da equação:

$$F(a; b) = \frac{s_a^2}{s_b^2} \quad (11)$$

Sendo s corresponde ao desvio padrão de cada replicata, o maior valor de s ocupa o numerador da razão, pois $F \geq 1$. O valor obtido para F é comparado com o valor de $F_{crítico}$ que é tabelado em função dos tamanho dos grupos de medidas ($N=11$), e do nível de confiança (em nosso caso de 95%), e para nosso teste $F_{crítico} = 2,191$. Se:

$$\begin{cases} F < F_{crítico} : \text{as variâncias comparadas não apresentam diferença estatística entre si} \\ F > F_{crítico} : \text{as variâncias comparadas apresentam diferença estatística entre si} \end{cases}$$

Em nosso caso foi realizado o teste F entre os 3 grupos, os dados e os valores de F encontram-se na Tabela 15. É possível observar que os três testes comparativos não apresenta diferença estatística entre si; desta forma podemos concluir que os dados encontram-se distribuídos de forma aleatória e homogênea entre as triplicatas^{71,76}.

Tabela 15: Dados, agrupamentos e resultados dos Testes F.

$C_{Zn^{2+}}$ (mol L ⁻¹)	Amostras			
	n=1	n=2	n=3	
2,00x10 ⁻⁵	14,964	14,725	15,124	F(n=1; n=2) 1,021
4,00x10 ⁻⁵	27,100	25,212	25,817	
6,00x10 ⁻⁵	34,266	35,591	29,760	
8,00x10 ⁻⁵	41,879	41,648	42,083	F(n=2;n=3) 1,011
1,00x10 ⁻⁴	48,163	58,119	55,922	
1,50x10 ⁻⁴	79,481	77,515	75,899	
2,00x10 ⁻⁴	94,030	100,847	85,784	F(n=1;n=3) 1,009
2,50x10 ⁻⁴	115,042	126,876	124,370	
3,00x10 ⁻⁴	141,670	139,669	141,403	
4,00x10 ⁻⁴	178,049	173,497	175,572	F _{crítico} 2,191
5,00x 0 ⁻⁴	212,510	219,572	217,540	
6,00x10 ⁻⁴	244,409	252,680	243,664	
Desvio padrão (s)	76,7949	78,4062	77,5211	

O teste de Cochran (C) é usado para verificar se o valor de maior variância presente entre os pontos de uma curva não está demasiadamente afastado da linha de tendência indicando a homogeneidade da distribuição das variâncias. O teste é feito a partir do seguinte cálculo:

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=0}^k s_i^2} = \frac{\text{Maior valor de variância}}{\text{Soma de todas as variâncias}} \quad (12)$$

Onde s corresponde ao desvio padrão dos resíduos

Compare-se o valor de $C_{calculado}$ com o valor de $C_{critico}$. Se:

$$\begin{cases} C < C_{critico} : A \text{ distribuição das variâncias é Homocedástica} \\ C > C_{critico} : A \text{ distribuição das variâncias é Heterocedástica} \end{cases}$$

Uma distribuição heterocedástica significa uma dispersão heterogênea de variâncias, enquanto em um comportamento homocedástico a distribuição das variâncias presentes na regressão é homogênea, indicando que o método e a equação usados foram adequados⁷⁶. Os dados das variâncias usadas no teste e os valores obtidos no teste C encontram-se na Tabela 16. Os valores de C indicam que a variância dos resíduos tem uma distribuição homogênea, ou seja, homocedástica, indicando que o modelo de regressão usado foi o mais adequado.

Tabela 16: Variância dos resíduos e dados do Teste C de Cochran.

Concentração	Variância dos resíduos (s^2)	
2,00E-06	0.9294	
4,00E-06	9.3434	Somatório das Variâncias
6,00E-06	0.0474	181,301
8,00E-06	27.3585	
1,00E-05	3.2179	
2,00E-05	56.8937	Maior Variância Observada
4,00E-05	38.8892	56,894
6,00E-05	1.1803	
8,00E-05	5.1936	
1,00E-04	13.2170	$C_{\text{calculado}}$
1,50E-04	25.0421	0,3138
2,00E-04	0.9294	
2,50E-04	0.9294	$C_{\text{crítico}}$
3,00E-04	9.3434	0,3924
4,00E-04	0.0474	
5,00E-04	27.3585	
6,00E-04	3.2179	

O teste de Durbin-Watson (D) é usado para verificar se existe interferência ou/e correlação entre os resíduos, ou seja, verifica-se os mesmos estão distribuídos de forma aleatória⁷⁶. Se os erros estiverem correlacionados, a regressão de mínimos quadrados pode subestimar o erro padrão dos coeficientes. Os erros padrão subestimados podem fazer com que seus valores pareçam significativos quando não são⁷⁶.

O teste de Durbin-Watson está condicionado ao ordenamento das medidas, desta forma os mesmos são devem ser organizados por ordem crescente dos valores da variável dependente, no nosso caso a concentração de Zn^{2+} . O teste é feito a partir da equação:

$$D = \frac{\sum_{t=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{t=2}^n e_i^2} \quad (13)$$

Sendo e_i = valor do resíduo a uma dada concentração de Zn^{2+} .

O valor de D é comparado com os valores de D_L (Limite superior) e D_U (Limite inferior) que são valores tabelados de acordo com o número de amostras e nível de confiança. Se:

$$\begin{cases} D < D_L: \text{Teste é conclusivo e o residuo está distribuido aleatoriamente} \\ D > D_U: \text{Teste é conclusivo e o residuo não está distribuido aleatoriamente} \\ D_L \leq D \leq D_U: \text{Teste é inconclusivo} \end{cases}$$

Desta forma, é possível avaliar a qualidade do modelo de regressão aplicado⁷². Os dados relativos ao teste D encontram-se na Tabela 17. O teste foi conclusivo e demonstrou que os resíduos se encontram dispersos de forma aleatória indicando que o método dos mínimos quadrados e o modelo de equação do 1º grau são adequados para a metodologia proposta.

Tabela 17: Dados e resultados do teste de Durbin-Watson.

$c_{Zn^{2+}}$ mol L ⁻¹	Resíduo (e_i)	$(e_i)^2$	$(e_i - e_{i-1})^2$	$c_{Zn^{2+}}$ mol L ⁻¹	Resíduo (e_i)	$(e_i)^2$	$(e_i - e_{i-1})^2$
$4,00 \times 10^{-5}$	-2,632	6,929	0,000	$2,00 \times 10^{-4}$	-8,341	69,564	226,894
$4,00 \times 10^{-5}$	-3,915	15,329	1,646	$2,50 \times 10^{-4}$	12,629	159,489	439,716
$4,00 \times 10^{-5}$	-4,520	20,432	0,366	$2,50 \times 10^{-4}$	0,795	0,632	140,044
$6,00 \times 10^{-5}$	-2,190	4,797	5,429	$2,50 \times 10^{-4}$	10,123	102,473	87,012
$6,00 \times 10^{-5}$	-8,021	64,340	34,001	$3,00 \times 10^{-4}$	7,033	49,468	9,546
$6,00 \times 10^{-5}$	-3,515	12,357	20,304	$3,00 \times 10^{-4}$	7,300	53,295	0,071
$8,00 \times 10^{-5}$	-3,951	15,613	0,190	$3,00 \times 10^{-4}$	5,299	28,083	4,004
$8,00 \times 10^{-5}$	-4,182	17,491	0,053	$4,00 \times 10^{-4}$	-1,118	1,250	41,180
$8,00 \times 10^{-5}$	-3,747	14,042	0,189	$4,00 \times 10^{-4}$	3,434	11,793	20,721
$1,00 \times 10^{-4}$	-5,716	32,676	3,877	$4,00 \times 10^{-4}$	0,957	0,916	6,136
$1,00 \times 10^{-4}$	2,043	4,173	60,202	$5,00 \times 10^{-4}$	2,680	7,182	2,968
$1,00 \times 10^{-4}$	4,240	17,975	4,827	$5,00 \times 10^{-4}$	-2,350	5,523	25,301
$1,50 \times 10^{-4}$	3,513	12,342	0,528	$5,00 \times 10^{-4}$	4,712	22,203	49,872
$1,50 \times 10^{-4}$	5,479	30,020	3,865	$6,00 \times 10^{-4}$	-2,425	5,882	50,939
$1,50 \times 10^{-4}$	1,897	3,599	12,831	$6,00 \times 10^{-4}$	-10,696	114,409	68,409
$2,00 \times 10^{-4}$	-0,095	0,009	3,966	$6,00 \times 10^{-4}$	-11,441	130,902	0,555
$2,00 \times 10^{-4}$	6,723	45,192	46,471				
				$\Sigma(e_i - e_{i-1})^2$			
				1372,113			
				$\Sigma(e_i)^2$			
				1080,378			
				D			
				1,270			
				D_U			
				1,321			
				D_L			
				1,577			

Com o modelo utilizado validado pelos três testes estatísticos como recomendados pelo IMETRO e ANVISA a curva analítica foi utilizada para obtenção dos limites de detecção e quantificação e a faixa de resposta linear. O LOD e LOQ podem ser estimados através das equações (4) e (5), onde s é o desvio padrão da prova em branco (Solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do L_N) e tampão Tris-HCl-KOH (0,10 mol L^{-1} pH-8,2) em água Ultrapura, e S é a sensibilidade analítica representada pela inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

$$LOD = 3 * \frac{s_{\text{Branco}}}{S} \quad (4)$$

$$LOQ = 10 * \frac{s_{\text{Branco}}}{S} \quad (5)$$

O LOQ foi proposto como o limite inferior da faixa linear de resposta (Figura 55) e o limite superior é o último ponto considerado para a curva analítica. Sendo assim os valores obtidos para estas figuras de mérito encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18: Figuras de mérito obtidas pela curva analítica para quantificação de Zn^{2+} na presença do sensor L_N .

Figura de Mérito	
LOD	5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$
LOQ	17,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Faixa de resposta linear	17,8-600 $\mu\text{mol L}^{-1}$

A precisão de uma metodologia numa validação costuma ser avaliada em três níveis distintos: a repetitividade (ou repetibilidade), precisão intermediária e reprodutibilidade⁷⁴.

A repetitividade ou repetibilidade é a condição de uma medida, e inclui os seguintes fatores: o mesmo procedimento, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, tal que as medições repetidas se reproduzem durante um curto período de tempo. Ela pode ser verificada através da avaliação de dois parâmetros: o desvio padrão relativo ($RSD(\%)$) ($RSD(\%) = s/\bar{x}$, onde s = desvio padrão das medidas e \bar{x} = média das medidas), e pela avaliação do HorRat

Resultados e Discussão

(Razão de Horwitz), dada pela equação de Horwitz ($RSD_{Horwitz_{calculado}} = 0,67 * 2^{1-0,5*\log[analito]}$) para uma determinada concentração média de analito. Este valor é comparado com RSD(%), espera-se que $RSD/RSD_{calculado}$ (HorRat) seja inferior a 1.^{47,72}

A repetitividade foi determinada, usando-se dois níveis de concentração, um no início e outro no meio da curva analítica, com 10 replicatas avaliadas em três períodos de tempo distintos após o preparo das amostras. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 19 e na Figura 56.

Tabela 19: Resultados dos ensaios de repetitividade avaliados pela razão HorRat.

	Nível 1			Nível 2		
	16h	20h	24h	16h	20h	24h
Média (\bar{x})	95,24	103,72	104,34	162,68	170,76	167,04
Desvio padrão (s)	3,37	3,67	2,50	6,33	4,02	5,11
RSD (%)	3,54	3,54	2,39	3,89	2,36	3,06
RSD Horwitz (calculado)	32,24	45,01	44,97	42,06	41,75	41,89
HorRat	0,11	0,08	0,05	0,09	0,06	0,07

*Nível 1: $c_{Zn^{2+}} = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; Nível 2: $c_{Zn^{2+}} = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$

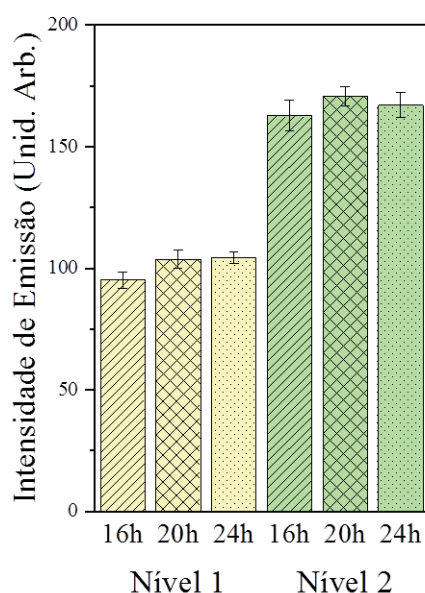


Figura 56: Resultados dos ensaios de repetitividade em três períodos de tempo e dois níveis de concentração (Nível 1: $c_{Zn^{2+}} = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; Nível 2: $c_{Zn^{2+}} = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Para verificar se houve variação significativa entre as médias das amostras nos períodos de tempo e na recuperação, aplicou-se o teste de Dixon para o menor e o maior valor. O teste de Dixon é usado para apontar a presença de valores afastados da amostra⁷⁰, estes valores são ordenados de ordem crescente e o valor de Q é estimado pela seguinte equação:

$$Q = \frac{|\bar{x}_n - \bar{x}_{n\pm 1}|}{|\bar{x}_{\text{máximo}} - \bar{x}_{\text{mínimo}}|} = \frac{|\text{valor testado} - \text{valor próximo}|}{|\text{maior valor} - \text{menor valor}|} \quad (14)$$

O valor de Q é comparado com o valor de $Q_{\text{crítico}}$ tabelado. Se:

$$\begin{cases} Q < Q_{\text{crítico}} : \text{Não existe variação significativa entre as médias} \\ Q > Q_{\text{crítico}} : \text{Existe Variação significativa entre as médias} \end{cases}$$

Desta forma foram calculados os valores de Q, como mostrado na Tabela 20, para três médias com 95 % de nível de confiança, e obtemos um $Q_{\text{crítico}}$ de 0,970. Foi possível verificar que em três períodos de tempo distintos não houve diferença estatística em função do tempo e nem na recuperação das amostras visto que os valores de Q calculados são inferiores ao $Q_{\text{crítico}}$.

Tabela 20: Teste de Dixon para o ensaio de repetibilidade.

Período	Média (\bar{x})			Maior valor	Q	Menor valor	Q
	16h	20h	24h				
Nível 1	95,24	103,72	104,34	104,34	0,068	95,240	0,932
Nível 2	162,68	170,76	167,04	170,76	0,460	162,680	0,540

Foi observado que todos os conjuntos de amostras e medidas se mantiveram constantes nos dois níveis de concentração durante o intervalo de tempo analisado. Refletindo em valores de HorRat inferior a 1, ou seja, foram aprovadas no teste visto que os valores de RSD experimentais se mostraram inferiores aos calculados para os dois níveis de concentração. Isso nos leva a concluir que o uso do sensor L_N para quantificação de Zn^{2+} como metodologia analítica apresenta uma repetitividade adequada.

A precisão intermediária pode ser entendida como a concordância de resultados de um mesmo laboratório obtidos em diferentes dias ou equipamentos ou analistas. Em nosso caso ela foi estimada a partir de experimentos intralaboratoriais realizados por dois analistas distintos. Analisou-se um nível de concentração no início da faixa de resposta linear de trabalho, sendo que foram realizados dez replicatas, em um intervalo de 20 h. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 21 e na Figura 57.

Tabela 21: Resultados dos ensaios de precisão intermediária avaliados pela razão HorRat.

	Analista 1	Analista 2
Média	22,58	22,91
Desvio padrão	1,00	1,94
RSD (%)	4,43	8,45
RSD Horwitz (teórico)	28,31	28,25
HorRat	0,16	0,30

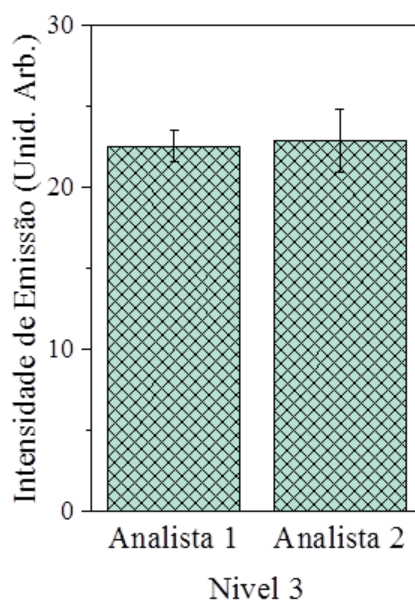


Figura 57: Resultados dos ensaios de precisão intermediária entre dois analistas no nível de concentração 3 ($c_{\text{Zn}^{2+}} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Os dois conjuntos de amostras foram aprovados no teste visto que o valor de HorRat encontra-se inferior a 1, demonstrando que os resultados obtidos por cada um dos analistas são reprodutíveis entre si. Segundo o teste F , não existe diferença significativa

entre os dois conjuntos de dados, pois $F(\text{Analista 1; Analista 2}) = 1,94$; $F_{\text{crítico}} = 2,98$, logo $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, e desta forma é possível afirmar que o método demonstrou repetitividade.

O terceiro nível de avaliação da precisão é dado pela reprodutibilidade. Este ensaio é dado pelo grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, e realizado sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.^{74,75}).

O estudo de robustez do método foi realizado com a finalidade de verificar os possíveis efeitos de variações dos parâmetros nominais. Foram avaliados os efeitos de armazenamento da amostra (temperatura e tempo), o solvente usado (pH e tipo de água) e condições de medida (temperatura e borbulhamento de argônio por 15 minutos). Foi usada uma concentração no início da curva analítica para atestar a robustez em condições de maior sensibilidade, ou seja, em baixas concentrações do analito, e portanto, em baixas intensidades de luminescência. A intenção desse experimento é avaliar as condições nominais, e poder atestar que as condições utilizadas foram as melhores. As condições nominais são aquelas que foram determinadas e usadas no processo de validação, e assim foram variados alguns parâmetros importantes e avaliamos de que forma cada um destes afeta a quantificação do analito. Os parâmetros tidos como nominais e suas variações encontram-se dispostos na Tabela 22.

Tabela 22: Parâmetros avaliados no teste de robustez.

	Parâmetros	Condição nominal	Condição variada
1	Armazenamento	TA	Geladeira (15~°C)
2	Origem da água	Ultrapura	Destilada
3	pH	8,2	7,8
4	Tempo	18 h	24 h
5	Atmosfera da análise	Ar	Inerte (Argônio)
6	Concentração do tampão(mol L ⁻¹)	0,10	0,08
7	Temperatura da análise	~25°C	~15°C

Foi utilizado o teste de Youden⁴⁷ para avaliar o efeito da variação dos parâmetros. Nele realizam-se sete ensaios separadamente em duplicata, dos quais se obtém o erro puro do efeito de cada variação. Os resultados encontram-se no gráfico de Pareto ilustrado na

Figura 58. Foi possível observar que variações no tipo de água utilizada, pH e a concentração do tampão causaram efeitos muito significativos, sendo estes dois últimos os mais críticos a serem mantidos. Esses dois parâmetros foram reprovados através da aplicação do teste F, pois o valor de F_{estimado} é superior ao F_{critico} como observado na Figura 58. Como apenas dois dos sete parâmetros avaliados foram considerados reprovados pelo teste, pode-se afirmar que o método é robusto nas condições analisadas, e que os parâmetros reprovados não devem ser alterados de maneira tão brusca para que se garanta a robustez no método.

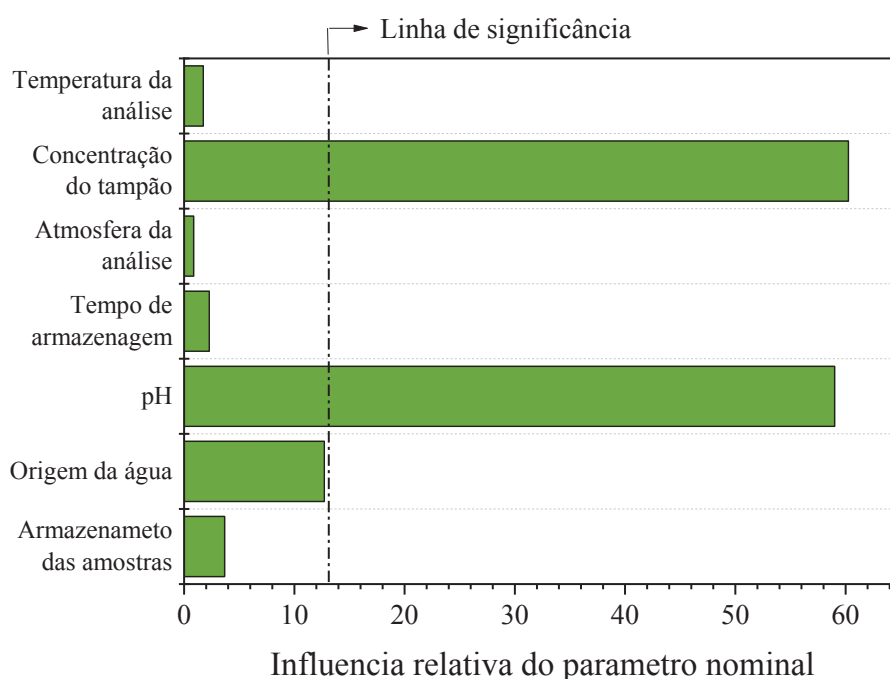


Figura 58: Gráfico de Pareto para os efeitos avaliados pelo planejamento fatorial fracionário.

4.2.3.2. Avaliação de possíveis interferentes

Com a intenção de avaliar a forma como outros íons em solução poderiam afetar a detecção de zinco, foi realizado ensaio de competição onde o íon de interesse encontra-se em concentração equimolar do possível interferente. No caso dos cátions foram usadas soluções dos respectivos cloretos e no caso dos ânions foram utilizados sais de sódio em função da solubilidade destes e da disponibilidade. Os resultados obtidos nestes ensaios encontram-se nas Figuras 59 e 60.

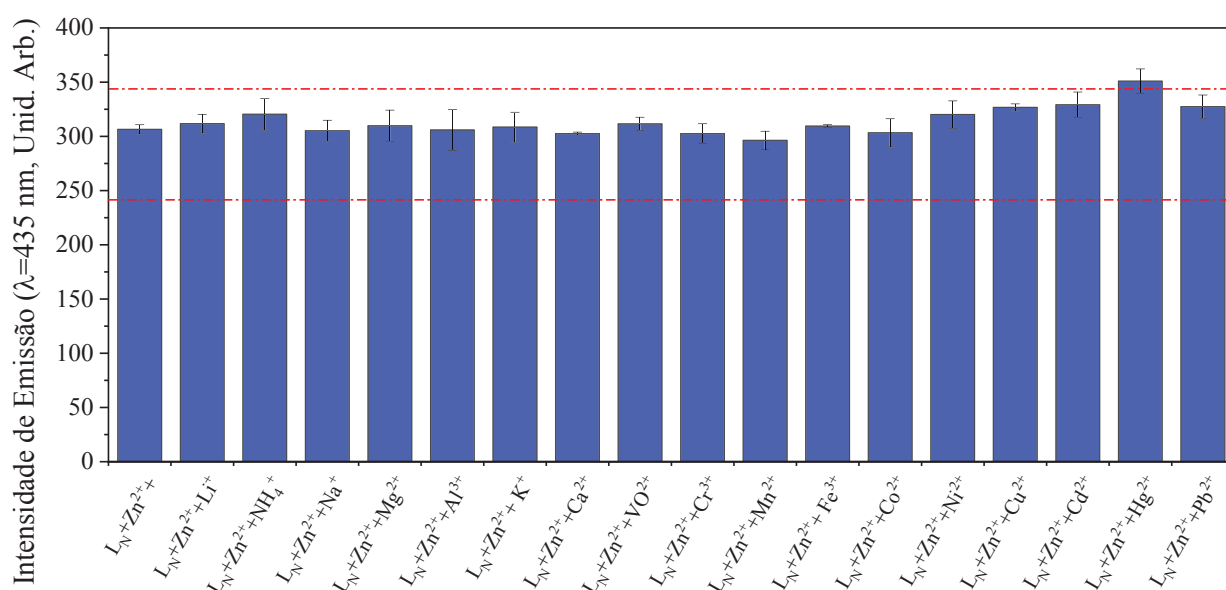


Figura 59: Avaliação de possíveis cátions interferentes.

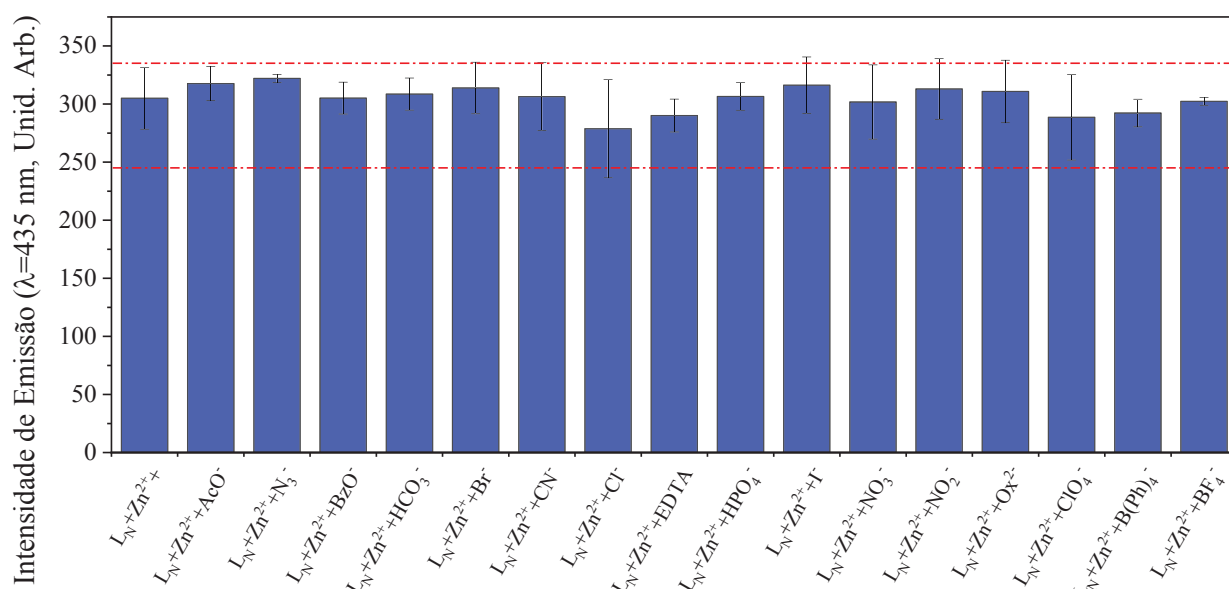


Figura 60: Avaliação de possíveis ânions interferentes.

Nos gráficos acima é possível ver que a maioria dos íons não apresenta potencial interferência na detecção do Zn^{2+} nas concentrações usadas. Este ensaio também indicou que o sensor apresenta uma grande afinidade pelo Zn^{2+} , ou seja, o complexo formado em solução manteve suas características de emissão em concordância com a estabilidade relativa do complexo sensor- Zn^{2+} na presença de diversos íons.

4.2.3.3. Aplicação da metodologia em amostras reais

Após a otimização de todos os parâmetros e estabelecimento das principais figuras de mérito, o método proposto foi avaliado em diferentes tipos de água e uma amostra mais complexa com o intuito de avaliar o comportamento do sensor frente a presença de outros interferentes naturais. Os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Resultado dos testes de recuperação para determinação de Zn^{2+} com o sensor L_N em diferentes tipos de amostra ($N=3$, e recuperação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Amostra	Fonte	Recuperação (%)
Água destilada	DQ/ UFPR	$103,92 \pm 3,67$
Água mineral	Comércio local (Marca A; sem gás)	$98,99 \% \pm 4,35$
Água da torneira	DQ/ UFPR	$91,92 \% \pm 1,12$
Fertilizante	Comércio local (Marca B)	$0,16 \% \pm 5,71$

Os resultados dos experimentos de recuperação mostraram que o uso do sensor L_N pode ser útil para a determinação do íon Zn^{2+} em diferentes amostras de água, possibilitando o uso sensor L_N em análises por sobreposição de matriz ou adição de padrão. Contudo também observou-se um baixo valor de recuperação em matrizes mais complexas como o fertilizante. Neste caso, possivelmente o íon metálico interage com várias outras moléculas orgânicas no produto comercial com afinidades relativas elevadas, inibindo a ação do sensor L_N .

4.2.3.4. Comparação do sensor L_N com outros sensores para Zn^{2+} descritos na literatura

A Tabela 44 apresenta dados de alguns sensores fluorescentes para o íon Zn^{2+} , onde é possível notar que o método analítico apresentou um valor de LOD ligante L_N apresenta um limite de detecção um pouco alto entre o sensores selecionados. Por outro lado, observa-se que o mesmo apresenta uma faixa de trabalho relativamente extensa, a maior

entre os sensores da tabela, o que é um diferencial positivo para o sensor L_N , bem como o uso de um sistema puramente aquoso em condições brandas de pH, além de não apresentar nenhum interferente entre os cátions investigados.

Tabela 24: Comparação entre as figuras de mérito analíticas e as constantes de afinidade obtidas para o sensor L_N com outros sensores para Zn^{2+} descritos na literatura.

Sensor	LOD	Faixa de resposta linear	Interferentes	Meio
L_N^*	5,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$	17,8 - 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	H ₂ O (pH=8,2)
2 ⁷⁷	500 nmol L ⁻¹	8 - 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	H ₂ O
3 ⁷⁸	10 nmol L ⁻¹	0,033 - 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Cu ²⁺ , Co ²⁺	H ₂ O (pH=7,0)
4 ⁷⁹	93 nmol	0,310 - 11 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Cd ³⁺ , Hg ³⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺	DMSO/H ₂ O (2:8)
5 ⁸⁰	41 nmol L ⁻¹	0,138 - 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	H ₂ O (pH= 11,0)
6 ⁸¹	0,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,64 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Al ³⁺ , Co ³⁺	CH ₃ CN
7 ⁸²	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	30 - 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺	CH ₃ CN/H ₂ O (1:5)
8 ⁸³	1,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	-	H ₂ O (pH=7,4)

* = este trabalho

A = Bis-*N,N'*-(salicilidien)-1,3-propanodiamina(LH₂)

B = 2-((dimetilamino)etil)amino)-*N*-quinolinilacetamide

C = 3,4,5-Trihidroxi-*N*-2-hidroxi-1-naptalenbenzohidrazida

D = 2-((di-isopropilamino)etil)amino)-*N*-quimolinyllacetamide

E = *N*-(quinolinil)picolinamida

F = *N',N'*-bis[(2-salicilidien)aminoetil]etano-1,2-diamina

G = 2-(etilamino)-*N*-quinolinilacetamida

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi descrita a síntese e a caracterização de três sensores fluorescentes, L_N , L_O e L_S , derivados da funcionalização da molécula de acridina. A composição dos produtos foi determinada pela combinação de diversas técnicas como análise elementar, espectrometria de massas, espectroscopias FTIR, RMN (de Hidrogênio e Carbono-13), absorção no UV-vis e de emissão fluorescente. As análises elementares mostraram que o ligante L_N encontra-se na forma de cloridrato e que o L_S foi isolado na forma de tiolato sódico. No espectro vibracional os sensores exibiram bandas comuns à molécula-mãe, acridina, bem como aquelas de vibrações associadas às novas funções químicas (OH, NH_2 e C-S, por exemplo) em concordância com a funcionalização da acridina. As transformações químicas foram confirmadas pela técnica de RMN, que mostrou poucos sinais, coerente com moléculas de alta simetria, contendo átomos de hidrogênio e de carbono com deslocamentos químicos e valores de integração coerentes com as composições propostas e próximos aos descritos na literatura. Em complemento às demais técnicas de caracterização, os espectros de massas exibiram picos dos íons moleculares característicos para as moléculas dos sensores L_N , L_O e L_S . Os perfis espectrais mostraram uma boa correspondência com aqueles gerados a partir das distribuições isotópicas dos elementos. Na espectroscopia de absorção no UV-Vis foi possível observar que os três sensores mostram duas bandas em 250 e 355 nm, atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$, respectivamente. Os ligantes mostraram melhor desempenho de emissão quando excitados na banda de 355 nm, havendo emissão na região do visível, com deslocamentos Stokes relativamente grandes de 75 a 90 nm, quando comparados a outros fluoróforos como o fluoreno, já explorados pelo grupo. As medidas de rendimento quântico mostraram valores inferiores a 1% o que impediu que as medidas de tempo de vida da fluorescência fossem realizadas.

Os três sensores foram usados em ensaios de seletividade frente à presença de diversos cátions. O sensor L_O não se mostrou sensível à presença de nenhum dos cátions testados nas condições aqui empregadas. Por outro lado, o ligante L_N mostrou-se um bom sensor, específico para a detecção do cátion Zn^{2+} em meio aquoso (pH = 8,2), observando-se uma intensificação da emissão luminescente acompanhada do deslocamento batocrômico da banda de emissão. Para o Ligante L_S , foi observado um comportamento de

supressão parcial da fluorescência na presença dos íons Cd^{2+} e Hg^{2+} , metais pesados que têm seu monitoramento de suma importância devido suas altas toxicidades.

Para ligante L_N , o complexo formado em solução foi caracterizado pelos ensaios de Job e Benesi-Hidelbrand, mostrando que o produto formado em solução é um complexo de estequiometria 2:1 metal:ligante L_N , e de composição provável $[\text{Zn}_2(\text{L}_\text{N})\text{Cl}_4]$ com constante de formação igual a $2,43 \times 10^{14} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$.

O uso do ligante L_N como metodologia para detecção de zinco foi proposto e submetido ao procedimento de validação analítica, onde observou-se limites de detecção e quantificação iguais a 5,79 e 17,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, uma faixa de resposta linear de 17,8 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método teve uma avaliação positiva frente aos testes de repetitividade e de precisão intermediária, sendo aprovado em dois diferentes níveis de concentração e pela análise por dois analistas diferentes em períodos distintos. Quando avaliado em testes de robustez, o método mostrou que as variações no pH e na concentração do tampão devem ser evitadas para que haja reprodutibilidade. Para verificar a interferência de alguns cátions e ânions na detecção de zinco foram realizados ensaios de competição, em concentrações equimolares, onde a grande maioria dos íons avaliados não mostrou ser um interferente relevante.

Quando avaliados os efeitos de matriz foi possível observar que o sensor se comporta bem em água destilada, mineral e potável, contudo em uma matriz mais complexa, como a do fertilizante, o método não se mostrou confiável.

Na comparação com alguns outros sensores luminescentes descritos na literatura, o sensor L_N mostrou a maior faixa de linear de utilização, sem apresentar interferentes importantes. Como aspecto negativo, observou-se um limite de detecção cerca de 1000 vezes menor que outros sensores que também operam em meio aquoso.

De fato, existem várias técnicas instrumentais tradicionais para a detecção de íons de mercúrio(II) e zinco(II). Mesmo assim, a maioria dessas técnicas possui limitações, exigindo preparação de amostras complexas e instrumentação dispendiosa, limitando sua aplicabilidade. Por outro lado este trabalho mostrou a potencialidade no uso de sensores moleculares fluorescentes sintéticos para detecção de analitos de maneira mais conveniente, com seletividade, sensibilidade, menor tempo de resposta, fácil amostragem e menores custo-benefício quando comparado a outras técnicas, particularmente em sistemas aquosos.

6. REFERÊNCIAS

1. WANG, B.; ANSLYN, E. V. **Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications**, Hoboken :John Wiley & Sons, 2011.
2. LEHN, J. **Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives**. Weinheim: VCH, 1995.
3. LEHN, J. Supramolecular Chemistry, **Science**, vol. 227, n. 4689, pg. 849-856, 1985.
4. ROGERS, C. W.; WOLF, M. O. Luminescent molecular sensors based on analyte coordination to transition-metal complexes, **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 233–234, p. 341–350, 2002.
5. ZHOU, X.; LEE, S.; XU, Z.; YOON, J. Recent Progress on the Development of Chemosensors for Gases, **Chemical Reviews**, vol. 115, n. 15, p. 7944–8000, 2015.
6. Burnworth, M.; Rowan, S. J.; Weder, C. Fluorescent sensors for the detection of chemical warfare agents, **Chemistry - A European Journal**, vol. 13, n. 28, p. 7828–7836, 2007.
7. CARTER, K. P.; YOUNG, A. M.; PALMER, A. E. Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems, **Chemical Reviews**, vol. 114, n. 8, p. 4564–4601, 2014.
8. VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS M. N. **Molecular Florescence: Principles and applications**, 2. ed. Weinheim: Winley-VCH, 2012.
9. LEMKE, E. A.; SCHULTZ, C. Principles for designing fluorescent sensors and reporters, **Nature Chemical Biology**, vol. 7, n. 8, p. 480–483, 2011.
10. KUZUYA, A.; MIZOGUCHI, R.; MORISAWA, F.; MACHIDA, K.; KOMIYAMA, M. Metal Ion-Induced Site-Selective RNA Hydrolysis by Use of Acridine-Bearing Oligonucleotide as Cofactor, **Journal of American Chemical Society**, n. 7, p. 6887–6894, 2019.
11. SWAGER, T. M.; MIRICA, K. A. Introduction : Chemical Sensors, **Chemical Reviews**, vol. 119, p. 1–2, 2019.
12. FABBRIZZI, L. The design of luminescent sensors for anions and ionisable analytes, **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 205, n. 1, p. 85–108, 2000.

13. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3. ed New York: Springer, 2006.
14. SKOOG, D. A. ; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of Analytical Chemistry**, 9. Ed . Nova York : Saunders College Pub., 2014
15. VALEUR, B.; **Molecular Florescence: Principles and aplications**, Weinhein: Winley-VCH,2001.
16. VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS M. N. **Molecular Florescence: Principles and aplications**, 2. ed. Weinhein: Winley-VCH, 2012.
17. WOLFBEIS, O. (Ed.) **Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications**, Springer: Berlim, 1993.
18. Esnal, I.; Bañuelos, J.; Arbeloa, L.; Costela, A. Electronic Supplementary Information Nitro and amino BODIPYS : Crucial substituents to modulate their photonic behavior, **RSC Advances**, n. February 2013, vol. 5, p. 1–27, 2012.
19. ALBANI, J. R. **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**, Blackwell Publishing, 2007.
20. JIANG, L.; LUO, Q.; DUAN, C.; SHEN, M. A new dioxotetraamine ligand appended with fluorenyl and its copper (II) complex . Synthesis , crystal structure and solution behavior, **Inorganica Chimica Acta**, vol. 295, p. 48–55, 1999.
21. RONDA, C. R. Emission and Excitation Mechanisms of Phosphors In: RONDA, C. R. (Ed.). **Luminescence: From Theory to Applications**, Weinhein, Winley-VCH, 2008.
22. Anslyn, E. V. Supramolecular analytical chemistry, *Journal of Organic Chemistry*, vol. 72, n. 3, p. 687–699, 2007.
23. HICKS, R. G.; KOIVISTO, B. D.; LEMAIRE, M. T. Synthesis of multitopic verdazyl radical ligands. Paramagnetic supramolecular synthons, **Organic letters**, vol. 6, n. 12, p. 1887–1890, 2004.
24. STEED, J. W.; ATWOOD, J. L. **Supramolecular Chemistry**, 2 Ed., Chippenham: Wiley, 2009.
25. DOS SANTOS CARLOS, F.; NUNES, M. C.; DE BONI, L.; MACHADO, G. S.; NUNES, F. S. A novel fluorene-derivative Schiff-base fluorescent sensor for copper(II) in organic media, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**,n. novembro, vol. 348, p.41-46, 2017.

26. DOS SANTOS CARLOS, F.; NUNES, M. C.; IGLESIAS, B. A.; ZAMBIAZI, P. J.; HÖRNER, M.; DE MORAES, G. A.; MACHADO, G. S.; RIBEIRO, R. R.; NUNES, F. S. Fluorenyl-Schiff-base ligands and their dicopper(II) complexes. Synthesis, structural and spectroscopic characterization and DNA binding assays, **Polyhedron**, n. abril, vol. 144, p.18-29, 2018.
27. GALY, J.; CHIRON, J. Reactivity of the Acridine Ring: A Review, **Synthesis**, vol. 3, p. 313–325, 2004.
28. WANG, Y.; HU, X.; WANG, L.; SHANG, Z.; CHAO, J.; JIN, W. A new acridine derivative as a highly selective ‘off-on’ fluorescence chemosensor for Cd^{2+} in aqueous media, **Sensors and Actuators, B: Chemical**, vol. 156, n. 1, p. 126–131, 2011.
29. RUBIO-PONS, Ò.; SERRANO-ANDRÉS, L.; MERCHÁN, M. A theoretical insight into the photophysics of acridine, **Journal of Physical Chemistry A**, vol. 105, n. 42, p. 9664–9673, 2001.
30. DIVERDI, L. A.; TOPP, M. R. Subnanosecond time-resolved fluorescence of acridine in solution, **Journal of Physical Chemistry**, vol. 88, n. 16, p. 3447–3451, 1984.
31. Zhou, Y.; Huang, Q.; Zhang, Q.; Min, Y.; Wang, E. A simple-structured acridine derivative as a fluorescent enhancement chemosensor for the detection of Pd^{2+} in aqueous media, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, vol. 137, p. 33–38, 2015.
32. ZHANG, D.; JIANG, S.; YANG, H.; MARTINEZ, A.; FENG, M.; DONG, G. Acridine-based macrocyclic fluorescent sensors: self-assembly behavior characterized by crystal structures and tunable bathochromic-shift in emission induced by H_2PO_4^- via adjusting the ring size and rigidity, **Organic & Biomolecular Chemistry**, vol. 11, n. 20, p. 3375–3381, 2013.
33. LEE, H. N.; KIM, H. N.; SWAMY, K. M. K.; PARK, M. S.; KIM, J.; LEE, H.; LEE, K. H.; PARK, S.; YOON, J. New acridine derivatives bearing immobilized azacrown or azathiacrown ligand as fluorescent chemosensors for Hg^{2+} and Cd^{2+} , **Tetrahedron Letters**, vol. 49, n. 7, p. 1261–1265, 2008.
34. WANG, Y.; SHI, L.; SUN, H. S.; SHANG, Z.; CHAO, J.; JIN, W. A new acridine derivative as a highly selective fluoroionophore for Cu^{2+} in 100% aqueous solution, **Journal of Luminescence**, vol. 139, p. 16–21, 2013.

35. HESS, F. K.; STEWART, P. B. Preparation of a New Immunosuppressant, 4,5-Bis(aminomethyl)acridine, **Journal of medical chemistry**, vol. 18, n. 3, p. 320–321, 1974.
36. LARONZE-COCHARD, M.; YOUNG-MIN, K.; BERTRAND, B.; RIOU, J.; LARONZE, J.; SAPI, J. Synthesis and biological evaluation of novel 4,5-bis(dialkylaminoalkyl)-substituted acridines as potentiomeric G-quadruplex ligands, **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 44, p. 3880–3888, 2009.
37. Di Giorgio, C.; De Méo, M.; Chiron, J.; Delmas, F.; Nikoyan, A.; Jean, S.; Dumenil, G.; Timon-David, P.; Galy, J.-P. Synthesis and antileishmanial activities of 4, 5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 13, p. 5560–5568, 2005.
38. CHIRON, J.; GALY, J. Reactivity of the Acridine Ring: One-Pot Regioselective Single and Double Bromomethylation of Acridine and Some Derivatives, **Synthesis**, vol. 3, p. 313–325, 2004.
39. ZHANG, Z.; KODUMURU, V.; SVIRIDOV, S.; LIU, S.; CHAFEEV, M.; CHOWHURY, S.; CJAKKA, N.; SUN, J.; GAUTHUER, S. J.; RATKAY, L. G.; KWAN, R.; THOMPSON, J.; CUTTS, A. B.; FU, J.; KAMBOJ, R.; GOLDBERG, Y. P.; CADIEUX, J. A.; MATTICE, M. Discovery of benzylisothiourreas as potent divalent metal transporter 1 (DMT1) inhibitors, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 1, p. 5108–5113, 2012.
40. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; P, W. **Organic Chemistry**, Oxford: Oxford University Press, 2000.
41. WARREN, S.; WYATT, P. **Organic Synthesis: The Disconnection Approach**, Weinhein: Wiley, 2009.
42. SEAL, B. K.; SIL, H. Independent determination of equilibrium constant by graphycal method, **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, vol. 38, n. 2, p. 289–292, 1982.
43. Asilan, E. V.; Dougherty, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**, Salzalito: University Science Books, 2006.
44. Moreira, M. B.; Franciscato, D. S.; Toledo, K. C. F.; De Souza, J. R. B.; Nakatani, H. S.; De Souza, V. R. Investigação da supressão de fluorescência de soro

- albumina bovina e humana por complexo de rutênio, *Química Nova*, vol. 38, n. 2, p. 227–232, 2015.
45. **Gold Book:** Chemistry Compendium of Chemical Terminology, International Union of Pure and Applied, 2014.
46. INMETRO. DOQ-CGCRE-008- orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo, revisão de 2016.
47. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para tratamento estatístico da validação analítica, 2018.
48. PAVIA, D. D.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**, 5 ed. Stamford-Cengage Learning, 2014.
49. COLEBROOK, L. D.; TARBELL, D. Evidence for Hydrogen Bonding in thiols from N.M.R. Measurements, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 47, p. 993–996, 1961.
50. HALL, C. M.; WEMPLE, J. A Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of Thiol Esters ¹³C NMR Study of Thiol Esters, **Journal of Organic Chemistry**, vol. 1714, n. 12, p. 2118–2123, 2011.
51. ACHESON, R. M. Acridine, In: **The chemistry of heterocyclic compounds - a series of monographs**, vol. 9, n. 4, John Wiley & Sons, 1973.
52. DESVERGNE, J. P.; CZARNIC, A. W. **Chemosensors of Ion and Molecule Recognition**, Bonas: Springer, 1997.
53. DE SILVA, A. P.; GUNARATNE, H. Q. N. ; GUNNLAUGSSON, T.; HUXLEY, A J. M; MCCOY C. P.; RADEMACHER, J. T.; RICE T. E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches, **Chemical Reviews**, vol. 113, n. 11, p. 1256–1258, 1989.
54. FORMICA, M.; FUSI, V.; GIORGI, L.; MICHELONI, M. New fluorescent chemosensors for metal ions in solution, **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 256, n. 1–2, p. 170–192, 2012.
55. MASHRAQUI, S. H.; CHANDIRAMANI, M.; GHORPADE, S.; UPATHAYAY, J.; MESTRI, R.; CHILEKAR, A. A simple 2,6-bis(2-benzimidazole)pyridyl incorporated optical probe affording selective ratiometric targeting of biologically and environmentally significant Zn²⁺ under buffer condition, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, vol. 84, n. 1–2, p. 129–135, 2015.

56. Noulas, C.; Tziouvalekas, M.; Karyotis, T. Zinc in soils, water and food crops, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, vol. 49, p. 252–260, 2018.
57. REDDY PULLAGURALA, V. L.; ADISA, I. O.; RAWAT, S.; KIM, B.; BARRIOS, A. C.; MEDINA-VELO, I. A.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review, **Environmental Pollution**, vol. 241, p. 1175–1181, 2018.
58. BARR, C. A.; BURDETTE, S. C. The zinc paradigm for metalloneurochemistry, **Essays In Biochemistry**, vol. 61, n. 2, p. 225–235, 2017.
59. Parkin, G. The bioinorganic chemistry of zinc: Synthetic analogues of zinc enzymes that feature tripodal ligands, **Chemical Communications**, n. 20, p. 1971–1985, 2000.
60. WINEMAN-FISHER, V.; BLOCH, D. N.; MILLER, Y. Challenges in studying the structures of metal-amyloid oligomers related to type 2 diabetes, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease, **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 327–328, p. 20–26, 2016.
61. CZAPLINSKA, B.; SPACZYNSKA, E.; MUSIOL, R. Quinoline Fluorescent Probes for Zinc – from Diagnostic to Therapeutic Molecules in Treating Neurodegenerative Diseases, **Medicinal Chemistry**, vol. 14, n. 1, p. 19–33, 2018.
62. Toma, H. E. Química Bioinorgânica e Ambiental, São Paulo: Blucher, 2015.
63. Oga, S.; Carvalho, M. M. A. de; Oliveira, J. A. de. Fundamentos de toxicologia, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2014.
64. QIU, Y. W.; WANG, W. X. Comparison of mercury bioaccumulation between wild and mariculture food chains from a subtropical bay of Southern China, **Environmental Geochemistry and Health**, vol. 38, n. 1, p. 39–49, 2016.
65. LACERDA, L. D. DE; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas, **Estudos Avançados**, vol. 22, n. 63, p. 173–190, 2008.
66. Brasil. Qualidade de Água, Diário Oficial da União, p. 64–68, 2008.
67. TANG, L.; HUANG, Z.; ZHENG, Z.; ZHONG, K.; BIAN, Y. A New Thiosemicarbazone-Based Fluorescence "Turn-on" Sensor for Zn²⁺ Recognition with a Large Stokes Shift and its Application in Live Cell Imaging, **Journal of Fluorescence**, vol. 26, n. 5, 2016.

68. LIU, X.; ZHANG, N.; ZHOU, J.; CHANG, T. A turn-on fluorescent sensor for zinc and cadmium ions based on perylene tetracarboxylic diimide, **Analist**, vol. 138, p. 901–906, 2013.
69. SUN, F.; ZHANG, G.; ZHANG, D.; XUE, L.; JIANG, H. Aqueous Fluorescence Turn-on Sensor for Zn^{2+} with a Tetraphenylethylene Compound, **Organic letters**, n. 13 vol. 24, p. 2009–2012, 2011.
70. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 5. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2005.
71. HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. **Data analysis for chemistry**-An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists, Nova York: Oxford University Press, 2006.
72. ELLISON, S. L. R.; BARWICK V. J, FARRANT T. J. D. **Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2009.
73. ROJAS-HERNA, A.; ROMERO-ROMO, M. Introduction to Validation of Analytical Methods: Potentiometric Determination of CO_2 , **Journal of Chemical Education**, vol. 94, p. 1303, 2017.
74. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA(ANVISA) – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 - guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos Documento de caráter orientativo, 2003.
75. RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H.; SALES, C.; JARDIM, F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, vol. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
76. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 5. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2005
77. ERGUN, E.; ERGUN, Ü.; ÖZGÜR, İ.; FATİH, M. Molecular and Biomolecular Spectroscopy An investigation of some Schiff base derivatives as chemosensors for Zn (II): The performance characteristics and potential applications, **Spectrochimica Acta Part A**, vol. 203, p. 273–286, 2018.
78. PARK, G. J.; LEE, J. J.; YOU, G. R.; NGUYEN, L.; NOH, I.; KIM, C. A dual chemosensor for Zn^{2+} and Co^{2+} in aqueous media and living cells: Experimental and theoretical studies, **Sensors & Actuators: B. Chemical**, n. 9, p. 129, 2015.

79. JIANG, L.-J.; LUO, Q.-H.; WANG, Z.-L.; LIU, D.-J.; ZHANG, Z.; HU, H.-W. A dioxotetraamine fluorenyl ligand and its nickel(II) complex — crystal structure and fluorescent sensing properties in aqueous solution, **Polyhedron**, vol. 20, n. 22–23, p. 2807–2812, 2001.
80. LIU, H.; TAN, Y.; DAI, Q.; LIANG, H.; SONG, J.; QU, J.; WONG, W. A simple amide fluorescent sensor based on quinoline for selective and sensitive recognition of zinc (II) ions and bioimaging in living cells, **Dyes and Pigments**, vol. 158, n. maio, p. 312–318, 2018.
81. SOHRABI, M.; AMIRNASR, M.; MEGHDADI, S.; LUTZ, M.; TORBATI, M. B.; FARROKHPOUR, H. A highly selective fluorescence turn-on chemosensor for Zn^{2+} , and its application in live cell imaging, and as a colorimetric sensor for Co^{2+} : experimental and TD-DFT calculations, **New journal chemistry**, n. 42, p. 12595–12606, 2018.
82. WANG, H.; KANG, T.; WANG, X.; FENG, L. A facile strategy for achieving high selective Zn (II) fluorescence probe by regulating the solvent polarity, **Talanta**, vol. 184, n. novembro de 2017, p. 7–14, 2018.
83. BOONKITPATARAKUL, K.; SMATA, A.; KONGNUKOOL, K. An 8-aminoquinoline derivative as a molecular platform for fluorescent sensors for Zn (II) and Cd (II) ions, **Journal of Luminescence**, vol. 198, n. September 2017, p. 59–67, 2018.

